RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER GLOMERULÄREN DECKZELLENVERÄNDERUNGEN UND IHRE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG BEI CASEININDUZIERTER NIERENAMYLOIDOSE DER MAUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von
Günther Beranek
aus Schönaich

1982

RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER GLOMERULÄREN DECKZELLENVERÄNDERUNGEN UND IHRE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG BEI CASEININDUZIERTER NIERENAMYLOIDOSE DER MAUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von
Günther Beranek
aus Schönaich

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1982
Dekan: Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Bohle
2. Berichterstatter: Prof. D. H. P. T. Ammon

Diese Arbeit widme ich meiner Frau und meinen drei Kindern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0010

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	
1.1	Stand der Forschung und Pathogenese der Amyloidose	1
1.2	Fragestellung	11
2	MATERIAL	
2.1	Versuchstiere	12
2.2	Geräte	12
2.3	Chemikalien	13
2.4	Nähr- und Reagenzlösungen	14
2.5	Sonstige Materialien	16
3	METHODEN	
3.1	Tierexperimentelle Erzeugung der Amyloidose	19
	3.1.1 Amyloidoseinduktion	19
	3.1.2 Versuchsdurchführung	19
3.2	Proteinausscheidung	22
	3.2.1 Volumetrische Bestimmung des ausgeschiedenen Urins	22
	3.2.2 Proteinbestimmung	22
3.3	Histologische Untersuchung	24
3.4	Rasterelektronenmikroskopische Präparations- und Aufnahmetechnik	25
	3.4.1 Einleitung	25

3.4.2 Wirkungsweise eines REM und die daraus folgenden Anforderungen an die Präparation 25

3.4.3 Präparation 27

3.4.4 REM-Aufnahmetechnik (Mikroskopiertechnik) 39

3.4.5 Quantitative Auswertung der REM-Aufnahmen 41

4 ERGEBNISSE

4.1 Methodik

4.1.1 Präparation 43

4.1.2 REM Technik 46

4.2 Untersuchung der Ausscheidungsfunktion 48

4.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von Milz und Nieren 50

4.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Nierenglomerula 54

4.5 Semiquantitative Auswertung der REM-Aufnahmen 88

5 DISKUSSION 90

6 ZUSAMMENFASSUNG 97

7 LITERATURVERZEICHNIS 99

ABKÜRZUNGEN

Å	Ångström (10^{-10}m)
Abb.	Abbildung(en)
Anat.	Anatomie
Anw.	Anwendung(en)
Aq.dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovin Serum Albumin
CPD	Critical Point Drying (Dryer)
exp.	experimentiell(e)
Inj.	Injektion(en)
IE	Internationale Einheiten
J.	Journal
med.	Medizin
min	Minuten
µm	Mikrometer (10^{-6}m)
nm	Nanometer (10^{-9}m)
PAS	Perjodic Acid Schiff`s Reaktion
Path.	Pathologie
REM	Rasterelektronenmikroskop(isch)
s.	siehe
SAA	Serum Amyloid A Protein
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(isch)
Vol.	Volume(s), Band

1 EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung und Pathogenese der Amyloidose

Die Amyloidose ist eine Systemerkrankung mit extrazellulärer Ablagerung von Amyloid, einem fibrillären Protein, das unter pathologischen Bedingungen gebildet und in den verschiedenen Organen deponiert wird. Bei den sogenannten sekundären Amyloidosen, d.h. Amyloidosen, die infolge einer primären Grundkrankheit auftreten, werden die Organe Milz, Leber und Niere in dieser Reihenfolge am meisten befallen. Die häufigsten Grundkrankheiten bei der sekundären systematisierten Amyloidose sind chronisch-eitrige Infektionen wie z.B. Osteomyelitis oder chronische Pleuraempyeme und darüber hinaus langdauernde entzündliche Systemerkrankungen, welche mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems einhergehen. Der wichtigste Vertreter der letztgenannten Krankheitsgruppe ist die rheumatoide Arthritis, bei der in etwa 10% der Fälle als Komplikation eine Amyloidose auftritt (2, 37).

Das erste und führende klinische Symptom zu Beginn einer Nierenamyloidose ist eine hohe Proteinurie, die im weiteren Verlauf der Erkrankung in ein nephrotisches Syndrom übergehen kann (10, 11, 45).
Neben der Ausbildung eines nephrotischen Syndroms zeigt die Nierenamyloidose im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung

eine zunehmende Tendenz zur Niereninsuffizienz (45). Die Niereninsuffizienz ist die Haupttodesursache der generalisierten Amyloidose (3, 44). Durch morphometrische Untersuchungen und Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Parametern der Nierenfunktion konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung der Niereninsuffizienz primär nicht von dem Ausmaß der glomerulären Amyloidablagerung bestimmt wird. Vielmehr wird die Niereninsuffizienz über einen zweiten, weitgehend unabhängigen pathogenetischen Mechanismus, nämlich durch eine Fibrosierung und Verbreiterung des Niereninterstitiums, verursacht (25, 41).

Beide Begleiterscheinungen der Amyloidose - das nephrotische Syndrom und die Niereninsuffizienz - müssen demnach auf verschiedene strukturelle Veränderungen zurückgeführt werden (11).

Bis heute ist die Pathogenese der sekundären systematisierten Amyloidosen weitgehend ungeklärt (16, 17, 39, 40). In klinischen und experimentellen Untersuchungen wurde bei chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen im Blut eine erhöhte Konzentration eines dem Amyloid verwandten Proteins gefunden. Dieses im Blut zirkulierende Protein, das in seiner Aminosäuresequenz weitgehend identisch ist mit Bruchstücken von Amyloidfibrillen, wurde Serumamyloid-A-Protein genannt (SAA) (34, 35).

Vermutlich ist dieses SAA, welches bei jeder immunologischen Abwehrreaktion gebildet wird, ein Vorläufer der Amyloid-

fibrillen. Man nimmt weiterhin an, daß SAA, welches eine hohe Affinität zu basalmembranartigen Strukturen zu haben scheint, sich in diesen Strukturen und der Mesangiummatrix der Niere ablagert und dort lokal eine Amyloidfibrillenbildung induziert (14).
Letztere könnte unter dem örtlichen Einfluß von lysosomalen Enzymen der ortsständigen Zellen zustande kommen. Die Amyloidfibrillenbildung aus SAA-Untereinheiten und weiteren Proteinkomponenten könnte hierbei als partielle Anverdauung der Proteine mit nachfolgender Polymerisation zu Fibrillenstrukturen aufgefaßt werden (21, 35, 42, 43).
Für diese Interpretation sprechen die ultrastrukturellen Befunde an Leber und Milz bei experimenteller Amyloidose der Maus (40), sowie die Befunde bei systematisierter Amyloidose des Menschen im Bereich der Nieren (14).

Amyloidfibrillen entstehen anscheinend unter enger Wechselwirkung zwischen SAA-Untereinheiten und ortsständigen Zellen. Neugebildete Amyloidfibrillen zeigen eine parallele Ausrichtung zur Zelloberfläche der ortsständigen Zellen (11). Im Wachsen befindliche Amyloidfibrillen invaginieren die Zellmembran und können, was auch transmissionselektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde (14), das gesamte Zytoplasma durchstoßen. Möglicherweise besitzt die Reaktion der ortsständigen Zellen wichtige Bedeutung für das Wachstum dieser spikeartigen Amyloidfibrillen.
Im Bereich der Niere bewirkt die Deponierung von Amyloidvorläufern bzw. die Einlagerung der ersten Amyloidfibrillen

eine Strukturveränderung der Mesangiummatrix und der Basalmembran. Diese Strukturveränderungen scheinen an den ortsständigen Zellen überschießende Reaktionen zu provozieren, welche als Regenerationsversuch der Struktur aufgefaßt werden müssen. Dabei werden lysosomale Enzyme in den Extrazellularraum abgegeben mit dem Ziel, die veränderte Struktur abzubauen. Unter der Anwesenheit von Amyloidvorläufern induzieren sie stattdessen eine Amyloidfibrillenbildung.
Die permanente Reaktion der ortsständigen Zellen führt dann über Bildung von Amyloidmassen zu ihrer totalen Zerstörung (14, 17, 39).

Eine Strukturregeneration kommt trotz der starken reaktiven Mechanismen der ortsständigen Zellen nicht zustande solange sich die Systemerkrankung in ihrer aktiv-produktiven Phase befindet. Erst wenn die Grundkrankheit beseitigt werden konnte und damit auch die Produktion von Amyloidvorläufern aufhört, bewirkt die gleiche Reaktionsweise der Zellen eine Strukturregeneration (11, 14, 15).
Bei den seltenen Fällen einer geheilten sekundären systematisierten Amyloidose, die elektronenmikroskopisch untersucht wurden, ist eine Strukturregeneration nachgewiesen worden. Sie umfaßt eine Abdeckung der Amyloidmassen durch basalmembranartige Strukturen, die im Bereich der Niere teils von den glomerulären Deckzellen, aber auch von den Endothelzellen bewerkstelligt wird. Auch im Bereich der Mesangiummatrix der Nierenglomerula, die bei den fortgeschrittenen Amyloidosen durch Amyloidmassen ersetzt wird, erfolgt eine Regeneration

in Form einer extrazellulären Anverdauung mit nachfolgender Resorption der Abbauprodukte und Ersatz der Amyloidstrukturen durch neu gebildete Mesangiummatrix und Mesangiumzellen (11, 15).

Ultrastrukturelle Befunde bei aktiven Amyloidosen weisen auf eine Beeinträchtigung der lokalen Kollagenproduktion hin. Am Ort der Amyloidbildung könnten lokal begrenzt in die Amyloidfibrillen primär für die Basalmembranregeneration produzierte Substanzen eingebaut werden (14).

Nach dem Wegfall polymerisationsfähiger Amyloid-Vorläufer-Proteine - z.B. durch Heilung der Grundkrankheit - normalisiert sich der lokale Kollagenstoffwechsel. Auch bei tierexperimenteller Amyloidose infolge täglicher Casein- oder Endotoxininjektionen beobachtet man eine Störung der Strukturregenration. Nach dem Absetzen der Injektionen findet wieder eine normale Regeneration statt.

Wichtig für die Amyloidbildung und die Strukturveränderungen der einzelnen Organe scheint das Vorhandensein im Blute zirkulierender Amyloidvorläufer zu sein, die an ihrem Ablagerungsort in den Organen örtlich begrenzt Veränderungen des Strukturstoffwechsels bewirken.

Die Ausbildung der Niereninsuffizienz bei der Amyloidose unterliegt eigenständigen pathogenetischen Mechanismen, welche durch die Grundkrankheit nur bedingt beeinflußt werden (13, 41).

Die glomerulären Ablagerungen alleine können die funktionellen Veränderungen der gesamten Niere nicht erklären. Mit zunehmender glomerulärer Amyloidose läßt sich rein statistisch eine zunehmende Tendenz zur Ausbildung einer Niereninsuffizienz erkennen.
Trotz dieser statistisch signifikanten Korrelation zwischen Schwere der glomulären Amyloidablagerung und Grad der Niereninsuffizienz findet man immer wieder Fälle von geringer Amyloidablagerung mit schwerster Niereninsuffizienz und Fälle von schwerer Amyloidablagerung mit leichter Niereninsuffizienz. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß die Amyloidablagerung für die Ausbildung einer Niereninsuffizienz alleine nicht ausschlaggebend sein kann.

Ein gewisser Einfluß der Proteinurie auf die Ausbildung der Niereninsuffizienz darf jedoch nicht übersehen werden. Aus klinischen Beobachtungen (5, 8, 10 , 22) weiß man, daß durch eine Reduktion der täglichen Proteinausscheidung durch therapeutische Eingriffe (die jedoch die Amyloidbildung nur wenig oder überhaupt nicht beeinflussen) zumindest "eindrucksmäßig" die Ausbildung der Niereninsuffizienz hinausgezögert wird.

Die hohen Proteinverluste über die Nieren führen infolge der Hypovolämie zu einer permanenten Ödembereitschaft im Interstitium. Diese dann chronisch verlaufenden Ödeme des Interstitiums könnten zur Kollagenisierung des Interstitiums beitragen (Bohle et al. in Vorbereitung).

Auf der anderen Seite kann das interstitielle Ödem auch durch eine Verminderung des onkotischen Druckes des Blutes hervorgerufen werden, da hierdurch der Flüssigkeitstransport aus dem Interstitium in die postglomerulären Kapillaren beeinträchtigt wird (12).
Die Ausbildung einer interstitiellen Nierenamyloidose ist auch bei schwerster glomerulärer Amyloidose nicht obligat.

Das interstitiell abgelagerte Amyloid stellt keine Barriere für den Saftstrom durch das Interstitium dar (12, 25, 38, 41). Eine interstitielle Fibrose verursacht dagegen einerseits eine Beeinträchtigung des Saftstromes durch das Interstitium und anderseits eine Verlängerung der Diffusionsstrecken für Sauerstoff, was zu einer zunehmenden Atrophie des Tubuluszellsystems führt (13, 41). Die zunehmende Tubuluszellatrophie kann dann ihreseits das Fortschreiten einer interstitiellen Fibrose mitbeeinflussen.

Das erste klinische Symptom, welches auf eine Mitbeteiligung der Niere bei einer Amyloidose hindeutet, ist eine hohe tägliche Proteinausscheidung. Die Proteinurie ist auch in der Frühphase der Erkrankung unselektiv, da die Strukturveränderungen die gesamte glomeruläre Filtationsbarriere umfassen. Bereits minimale glomeruläre Ablagerungen, die nur elektronenmikroskopisch erkennbar sind, können eine hohe Proteinurie erzeugen, die bereits in der Frühphase zum nephrotischen Syndrom führen kann (14,45).

Verantwortlich für die hohe Proteinurie sind vorwiegend Deckzellaufbrüche im Bereich der glomerulären Filtrationsbarriere. Schon in der Frühphase der glomerulären Amyloidose können sie auftreten. In fortgeschrittenen Stadien der glomerulären Amyloidose besteht eine diffuse bis herdförmige Durchsetzung der Mesangiummatrix und der glomerulären Basalmembran mit Amyloid. Über diesen von Amyloid durchsetzten Strukturelementen zeigen die glomerulären Deckzellen einen Verlust der Deckzellfüßchen. Bei aggressiven glomerulären Amyloidosen, die gekennzeichnet sind durch eine Vielzahl von spikeartigen Amyloidfibrillen, welche die glomeruläre Deckzellen invaginieren und zerstören, findet man darüber hinaus flächenhafte Ablösungen der glomerulären Deckzellen von der glomerulären Basalmembran. Durch diese Löcher in der glomerulären Filtrationsbarriere können Proteine aus dem Blut in erhöhtem Maße in den Bowmanschen Kapselraum übertreten. Verantwortlich ist de lokal erhöhte transmembranöse Wasserfluß durch diese Strukturdefekte (11, 14). Die Proteine - und hierbei insbesondere Albumin - werden infolge der erhöhten Konvektionskräfte des Filtrats durch die Filtrationsbarriere mitgerissen und gelangen in das Tubulussystem.

Die Amyloidosen des Menschen erscheinen aufgrund ihrer Ultrastruktur in den meisten Fällen extrem aggressiv, was sich in dem spikeartigen Wachstum der Amyloidfibrillen und der Zerstörung der glomerulären Strukturen äußert. Das menschliche Amyloid ist darüber hinaus durch einen hohen Fibrillengehalt bei rückgebildeter extrazellulärer Matrix gekennzeichnet.

Demgegenüber besteht das experimentell erzeugte tierische Amyloid zu einem hohen Prozentsatz aus extrazellulärer, elektronenoptisch homogener Matrix mit unterschiedlich dichter Fibrilleneinlagerung. Die Amyloidosen beim Menschen zeigen ultrastrukturell sehr früh Veränderungen im Bereich des subepithelialen Raumes der Kapillarwand. Die tierexperimentellen Amyloidosen beginnen vorwiegend im subendothelialen Raum, verändern dann sukzessiv die gesamte Basalmembranstruktur und beginnen, sobald die Basalmembran zerstört ist, in den subepithelialen Raum vorzudringen.

Unter physiologischen Bedingungen stellt die Basalmembran eine Gleitschiene für die Ausbildung der Fußfortsatzverzahnung dar. Wenn die Basalmembran verändert wird, z.B. durch die Einlagerung von Immunkomplexen oder durch Amyloidfibrillenvorläufer, läßt sich an den glomerulären Deckzellen ein Verlust der Deckzellenfußfortsatzverzahnung beobachten. Der Fluß des Filtrates erfolgt vorwiegend durch die sogenannten Filtrationsschlitze der Deckzellen. Daher beeinflußt die Fußfortsatzverzahnung in hohem Maße die effektive Filtrationsfläche des gesamten Glomerulums.

Bezüglich der Proteinurie zeigen reine Basalmembranveränderungen eine geringere Wirkung als die Zerstörung der glomerulären Deckzellen. Es zeigte sich, daß schwere glomeruläre Amyloidosen mit weitgehender Zerstörung der glomerulären Basalmembran und dichten, vorwiegend subendothelialen Amyloidablagerungen nur eine geringe Proteinurie und einen normalen

Serumeiweißspiegel aufweisen, falls der glomeruläre Deckzellenüberzug weitgehend erhalten ist.
Bei Amyloidosen des Menschen können Veränderungen an den Deckzellen erst beobachtet werden, wenn die Basalmembran bis in den subepithelialen Raum verändert ist oder Amyloidvorläufer bei den aggressiven Formen der Amyloidosen frühzeitig im subepithelialen Raum abgelagert werden. In diesem Sinne ist der Ablagerungsort für den klinischen Verlauf einer Nierenamyloidose von Bedeutung.

Die Amyloidosen des Menschen sind zum Studium der frühen Veränderungen an den Deckzellen nur bedingt geeignet. Besonders bei den aggressiven Formen läuft die Amyloidproduktion im subepithelialen Raum ab, und dann treten frühzeitig schwerste Deckzellenschädigungen auf.

Zur Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Deckzellenaffektionen im Verlauf der Amyloidentwicklung ist es deshalb notwendig, auf das Tiermodell zurückzugreifen.

1.2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit hat folgende Ziele:

- Tierexperimentelle Erzeugung einer Amyloidose an Mäusen
- Entwicklung geeigneter Präparationstechniken für die Rasterelektronenmikroskopie und umfassende Darstellung der methodischen Aspekte
- Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der glomerulären Deckzellenveränderungen im Verlauf der Amyloidentwicklung
- morphometrische Dokumentation des Verlustes der Deckzellenfußfortsatzverzahnung im Zusammenhang mit der Amyloidentstehung und Amyloideinlagerung
- Interpretation der Strukturveränderungen.

2 MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Stammes "C 57 BL 6 J" mit einem Gewicht von ca. 30 g des Instituts für Versuchstierzucht in Hannover verwendet.

Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur von 21-23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55-60% im 12 Std. Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Sie erhielten das Standard- Diätfutter Nr. H 1003 der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser nach Belieben.

2.2 Geräte

Bedampfungsanlage BA 360	Fa. Balzers, Frankfurt/M
Critical Point Dryer SPC 900 (Abb. 1)	Bomar, Fa. Cambridge Instrument Comp., Dortmund
Haarnadelkathoden Ebtec für REM AMR 1000	Fa. Plano, Marburg
Lichtmikroskop Dialux 20	Fa. Zeiss, Oberkochen
Mäusehalterung zum Spritzen	eigene Konstruktion
Okularstrichplatte 400 x 0,25 mm²	Fa. Wild, Heerbrugg

Perfusionsapparatur	eigene Konstruktion
REM AMR 1000 (Abb. 2)	Fa. Leitz, Wetzlar
Schichtdickenmeßgerät OSG/201	Fa. Balzers, Frankfurt/M
Spektralphotometer DMR 10	Fa. Zeiss, Oberkochen
Spritzen 1 ml mit G 12 Kanülen	Fa. Braun, Melsungen
Sputteranlage Polaron E 5200 (Abb. 4)	Dr. Hert, München
Stereomikroskop M 8	Fa. Wild, Heerbrugg
Stoffwechselkäfig (Abb. 3)	eigene Konstruktion
Weitwinkelobjektiv für M 8, Vergrößerung 0,4-fach	Fa. Wild, Heerbrugg

2.3 Chemikalien

Bovin Serum Albumin (BSA)	Fa. Serva, Heidelberg
Casein nach Hammarsten Nr. 2242	Fa. Merck, Darmstadt
Heparin, Na (25000 IE/ 2 ml) A.	medac GmbH, Hamburg
Kohlendioxid flüssig, techn.	Fa. Mast Tübingen
Isotone-Kochsalzlösung 0,9%	Fa. Braun, Melsungen
Neofin blau Entwickler	Fa. Tetenal, Hamburg
Papaveron (50 mg/ 2 ml) Amp.	Karlspharma GmbH, Karlsruhe
Rollfilm HP 5 und Ilfospeed-Fotopapier	Fa. Ilford, München

Alle nicht genannten Chemikalien wurden in der jeweils reinsten Form (p.a.) von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

2.4 Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1 Benedicts Reagenz (1)

1,7 g Kupfer(II)sulfat 5 Hydrat
10,0 g Natriumcarbonat wasserfrei
17,3 g Natriumcitrat 2 Hydrat
alles in 100 ml Aq. dest. lösen.

2.4.2 0,1 m- Cacodylatpuffer pH 7,4

21,4 g Dimethylarsinsäure, Na-Salz, Trihydrat
werden in 900 ml Aq. dest gelöst und
mit 0,1 N-HCl auf pH 7,4 eingestellt
und ad 1000 ml aufgefüllt.
Anw.: u.a. zur Verdünnung von Osmiumsäure und
Glutaraldehyd.

2.4.3 Cacodylatpuffer mit Saccharose

Ansatz wie 2.4.2 plus
68,4 g Saacharose (anstelle der gleichen Menge
Aq. dest.).

2.4.4 10% Caseinlösung

1,00 g Casein nach Hammarsten
+ 10,0 g NaCl-Lösung 0,9% (die zuvor mit 250 µl NaOH konz. versetzt wurde).

2.4.5 4% Formalinlösung pH 7,4

108,0 ml Formalin 37%
+ 18.7 g NaH_2PO_4
+ 4,2 g NaOH
auf 800 ml mit frischem Aq. dest. auffüllen und mit 0,1 N-HCl auf pH 7,4 einstellen und dann auf 1000 ml verdünnen.

2.4.6 2% Glutaraldehyd

Aus 25%-igem Glutaraldehyd durch Verdünnen mit 2.4.2 hergestellt.

2.4.7 2% Osmiumsäure

1 g Osmiumsäure in 25 g Aq. dest. auflösen und dann mit 25 g Cacodylatpuffer (2.4.2) verdünnen.

2.5 Sonstige Materialien

Leit-C nach Göcke	Fa. Neubauer, Münster
Golddraht, reinst 0,2 mm ø	Fa. Balzers, Frankfurt
Leitsilber	dto.
Probenteller für AMR 1000	Fa. Plano, Marburg

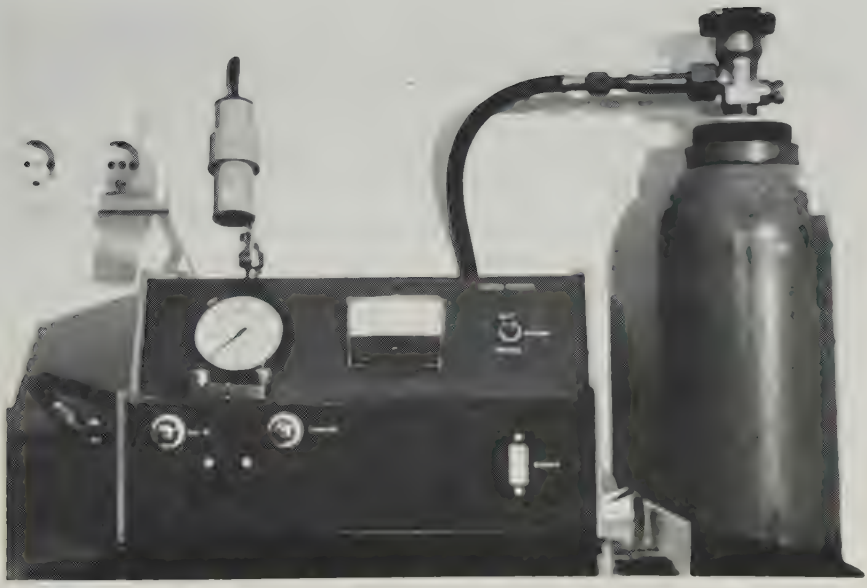
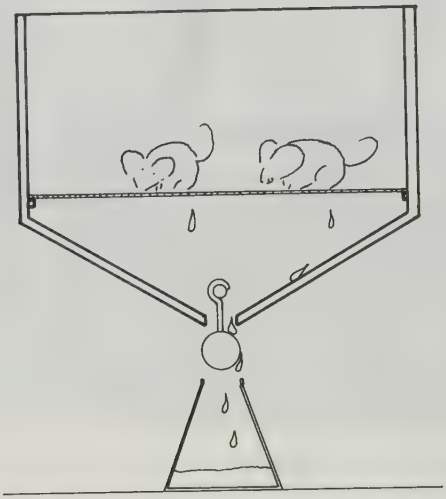


Abb. 1 Gerät zur Trocknung Bomar CPD SPC - 900

Abb. 2 Rasterelektronenmikroskop Leitz - AMR 1000

Abb. 3 Stoffwechselkäfig mit Urinauffangvorrichtung (Schnitt)



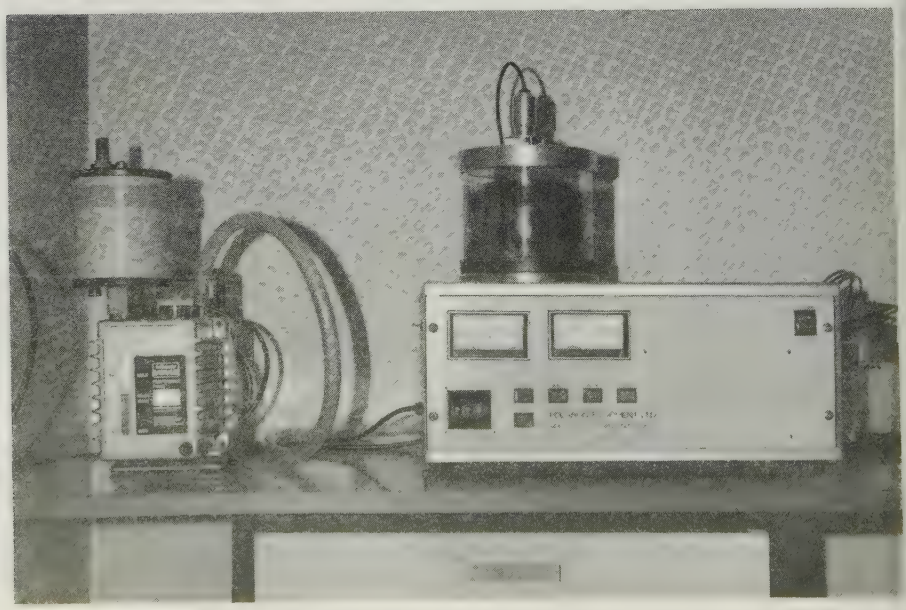


Abb. 4 Sputteranlage Polaron SEM E 5200

3 METHODEN

3.1 Tierexperimentelle Erzeugung der Amyloidose

3.1.1 Amyloidoseinduktion

Injiziert man männlichen Versuchsmäusen des Stammes "C 57 BL 6 J" Casein, so induziert man bei ihnen innerhalb weniger Wochen eine sekundäre Amyloidose (24, 26, 37).
Dabei ist folgender Mechanismus der Amyloidentstehung vorstellbar:
Durch ständige Stimulierung der B-Zellen des lymphatischen Systems infolge Caseininjektionen wird über Mediatoren ein hoher Serum-Amyloid-A-Spiegel erzeugt, der seinerseits zur sekundären Amyloidose führt (Hyperimmunisierung).

3.2.2 Versuchsdurchführung

30 Mäuse wurden in 6 Gruppen zu 5 Mäusen aufgeteilt. Die Gruppe 0 war die Leergruppe (Kontrollgruppe) und bekam während der Versuchsdauer keine Caseininjektionen. Die Gruppen 1 bis 5 wurde gemäß Tab. 1 gespritzt. Die Gruppe 5 wurde nochmals in Untergruppen 5a, 5b und 5c mit jeweils 8, 9 und 10 Behandlungszyklen (Wochen) unterteilt.

Mit Hilfe von 1 ml Insulinspritzen mit G 12er Kanülen und eines speziellen Spritzkäfigs injizierte man 0,5 ml einer 10% Caseinlösung (2.4.4) 3 bis 10 Wochen lang. Die Injektionen erfolgten subcutan in den Rücken der Mäuse an 5 Werktagen pro Woche (5 Injektionen á 0,5 g Caseinlösung, dann 2 Tage Pause).

Wahrend des Versuchs wurde die Ausscheidungsfunktion kontrolliert.

GRUPPE	MAUS NR.:	SPRITZZYKLEN Wo.-Inj.	GESAMTDOSIS/ Tier in g
1	M 1 M 2* M 3* M 4 M 5	3 x 5	0,75
2	M 6* M 7* M 8* M 9 M 10	4 x 5	1,00
3	M 11 M 12 M 13* M 14 M 15	5 x 5	1,25
4	M 16 M 17 M 18 M 19 M 20*	6 x 5	1,50
5 a	M 21*	8 x 5	2,00
b	M 22* M 23	9 x 5	2,25
c	M 24* M 25*	10 x 5	2,50
0	M 26 M 27 M 28 M 29 M 30	-Kontrollgruppe- (keine Caseininjektionen)	

Tab. 1: Einteilung in Versuchsgruppen und Spritzzyklen
*) REM-dokumentiert und morphometrisch vermessen.

3.2 Proteinausscheidung

3.2.1 Volumetrische Bestimmung des ausgeschiedenen Urins

Damit genügend Urin für die Messungen gesammelt werden konnte wurden die Mäuse paarweise - einmal pro Woche für 24 Stunden - in den Stoffwechselkäfig gesetzt (Abb. 3).
Danach entnahm man die Uringläschen und ermittelte die Urinmenge volumetrisch.
Anschließend erfolgte das Einfrieren der Proben auf - 40 °C zur späteren Proteinbestimmung.

3.2.2 Proteinbestimmung

Mit Hilfe einer Standardlösung BSA (1 mg/10 ml) und einer Eichgeraden wurde der unbekannte Proteingehalt der Mäuseurinproben ausgerechnet (Mikrobiuret-Methode).
Erstellen der Eichgeraden:

20 µl Proteinlösung (mit 10, 20 ... oder
100 µg BSA aus Verdünnungsreihe),
+ 130 µl Aq. dest.,
+ 15 µl Benedicts Reagenz,
+ 150 µl NaOH.

Dieser Ansatz wurde gut umgeschüttelt, 15 min stehengelassen

und dann die Extinktion bei 330 nm gegen den Reagenzienleerwert mit dem Zeiss Photometer gemessen.

Anschließend wurden den aufgetauten Urinproben der Mäuse mit der Eppendorfpipette jeweils 20 µl entnommen und wie mit der Standardlösung verfahren.
Die Extinktion der Verdünnungsreihe wird gegen die Konzentration aufgetragen. Die Berechnung des unbekannten Proteingehaltes der Mäuseurinproben erfolgte nach der Eichgeraden.

3.3 Histologische Untersuchungen

Alle Mäuse wurden einer lichtmikroskopischen, histologischen Kontrolle unterworfen.

Ziel dieser Untersuchung war es:

- den Befund Amyloidose histologisch abzusichern,
- den Verlauf der Amyloidose auch lichtmikroskopisch festzuhalten und
- die Ausbreitung (Inzidenz) in Milz, Leber, Darm und Niere zu erfassen.

Hierzu wurden 12 Schnitte pro Maus angefertigt.

ORGAN	FÄRBUNGEN (Präparatentnahme nach 3.4.3.2)			
Niere	Kongorot	Hämatoxilin/Eosin	PAS	
Milz	"	"	"	
Leber	"	"	"	v. Gieson
Darm	"	"	"	"

Tab. 2: Durchgeführte histologische Färbungen (6)

Van Gieson- und Hämatoxilin/Eosin-Färbung dienen der Übersicht. Mit Kongorot lassen sich selektiv Amyloidfibrillen, mit PAS die Basalmembran darstellen.

3.4 Rasterelektronenmikroskopische Präparations- und Aufnahmetechnik

3.4.1 Einleitung

Das REM erlaubt Abbildungen mit ca. 300-fach größerer Tiefenschärfe (noch 10 µm bei 30000-facher Vergrößerung) und zehnmal größerem Auflösungsvermögen (im Routinebetrieb ca. 300 nm) als das Lichtmikroskop. Soll deshalb die räumliche Struktur einer Oberfläche - wie hier die des Glomerulums - abgebildet werden, so ist das REM das Gerät der Wahl (19, 29, 31, 33).

Es ergänzt in idealer Weise das Lichtmikroskop (farbige Gewebeabbildung) und das Transelektronenmikroskop (dessen Vorteil ist eine nochmals um eine 10er Potenz gesteigerte Auflösung gegenüber dem REM, jedoch nur an dünnen Schichten). Zusätzlich lassen sich durch apparative Zusätze am REM auch quantitative Untersuchungen vornehmen.

3.4.2 Wirkungsweise eines REM und die daraus folgenden Anforderungen an die Präparation

Das REM besteht aus einer elektromagnetischen Linsenanordnung und Lochblenden, die die Elektronenquelle (Haarnadelkathode) stark verkleinern. Damit wird, einer langbrennweitigen Linse ähnlich, in einer evakuierten Säule ein feiner Elektronen-

strahl erzeugt. Dieser nur etwa 200 Å breite Strahl tastet die Probe zeilenförmig ab.
Die von der Probe rückgestreuten und die sekundär aus ihr herausgeschleuderten Elektronen fängt ein Detektor (Szintillationszähler) auf. Die dort ausgelösten Lichtimpulse werden über die Fotokathode eines Multipliers geleitet und kascadenartig verstärkt. Dieser Strom moduliert einen synchron zum Abtaststrahl abgelenkten Bildstrahl einer kleiner Fernsehbildröhre. Sie hat einen stark nachleuchtenden Monitor zur Objektbeobachtung; ein weiterer sehr feinkörniger Aufnahmebildschirm dient der fotografischen Dokumentation.

Lichtmikroskop und TEM bilden alle Objektpunkte gleichzeitig ab, das REM jedoch zeitlich nacheinander. Das Bild auf dem Leuchtschirm entsteht nur durch Nachleuchten.
Für eine hohe Auflösung ist maßgebend, daß

- der Elektronenstrahldurchmesser klein ist (er bestimmt die Mindestauflösung des REM),
- die Elektronenstrahlintensität möglichst hoch ist (Gegensatz zu oben),
- die Empfindlichkeit des Detektors, d.h. das Signal-Rausch-Verhältnis, gut ist.

Da die modernen REM ein hohes technisches Niveau besitzen, ist eine Verbesserung der Abbildungsqualität (bei guter Aufnahmetechnik) nur noch über eine Optimierung der Präparation möglich.

Aus der vereinfachten Darstellung der Wirkungsweise eines REM ergeben sich folgende Anforderungen an die Präparation.

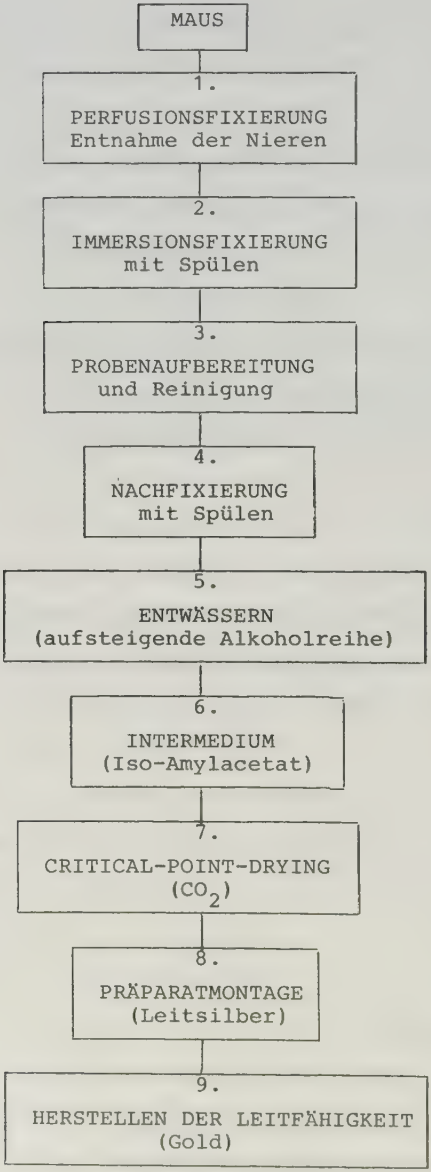
Die zu untersuchenden Objekte müssen:
- den Elektronenbeschuß aushalten können (Wärmebelastung),
- hochvakuumbeständig sein (formstabil, d.h. nicht gasen),
- leitend sein (Aufdampfen, Besputtern, Räuchern),
- eine hohe Sekundärelektronenausbeute liefern (damit ein starkes Signal),
- sauber sein (keine Beläge, Staub etc.).

Diese Voraussetzungen liegen bei den meisten biologischen Proben nativ nicht vor. So schließt z.B. der hohe Wassergehalt der medizinisch-biologischen Proben die Vakuumbeständigkeit aus. Eine sorgfältige Dehydratation der Proben ist deshalb unumgänglich.

Eine artefaktfreie Oberfläche zu bekommen, muß das Ziel einer guten Präparation sein. Zusammen mit einwandfreier Bedienung des REM ergibt dies beste Aufnahmequalität.

3.4.3 Präparation

Die Präparation erfolgte nach folgendem Präparationsschema (32) (Tab. 3: Präparationsschema/modifiziert/nach Rosenbauer).



Tab. 3: Präparationsschema

3.4.3.1 Perfusionsfixierung und Entnahme der Nieren

In tiefer Äthernarkose öffnet man Bauch- und Thoraxraum mit einer Schere und präpariert das Thoraxschild weg. Durch einen Einschnitt an der Spitze des linken Ventrikels des freiliegenden Herzens erfolgt die Einlage einer Knopfkanüle. Diese wird bis an die Aorta vorgeschoben und mit Hilfe einer federnder Klammer mit zusätzlich angebrachten, gebogenen Drahtbügeln befestigt.
Durch die Knopfkanüle infundiert man nun physiologische Kochsalzlösung von 37 °C. Zuvor wurde in diese isotone Kochsalzlösung pro Liter je 1 Ampulle Papaveron (50 mg/ 2 ml) und Heparin, Natrium (25000 IE/ 2 ml) injiziert (18).

Unmittelbar nach Beginn der Infusion eröffnet man das rechte Herzohr, um den großen und den kleinen Blutkreislauf mit Kochsalzlösung völlig blutleer zu spülen. Nach ca. 1 min beginnt die Perfusionsfixierung mittels einer 2%igen Glutaraldehydlösung in 0,1 m-Cacodylatpuffer pH 7,4. Beendet wird sie nachdem die Organe eine deutlich feste Konsistenz aufweisen (nach ca. 2 - 3 min).
Jetzt entnimmt man beide Nieren, die Milz, den Darm und den Thymus.

Beim Spülen und Fixieren müssen Schrumpfungen und Quellungen verhindert werden. Parameter sind Temperatur, Konzentration, Einwirkungsdauer sowie Zusätze des Fixiermittels.

Außerdem beobachtete Rosenbauer, daß es bei der Anwendung von Fixationsgemischen infolge verschiedener Diffusionszeiten der einzelnen Komponenten zur Entmischung der Reagenzien kommen kann. Weiterhin ist es möglich, daß sich gesunde und pathologisch veränderte Gewebe gegenüber Fixiermitteln unterschiedlich verhalten (32, 33).

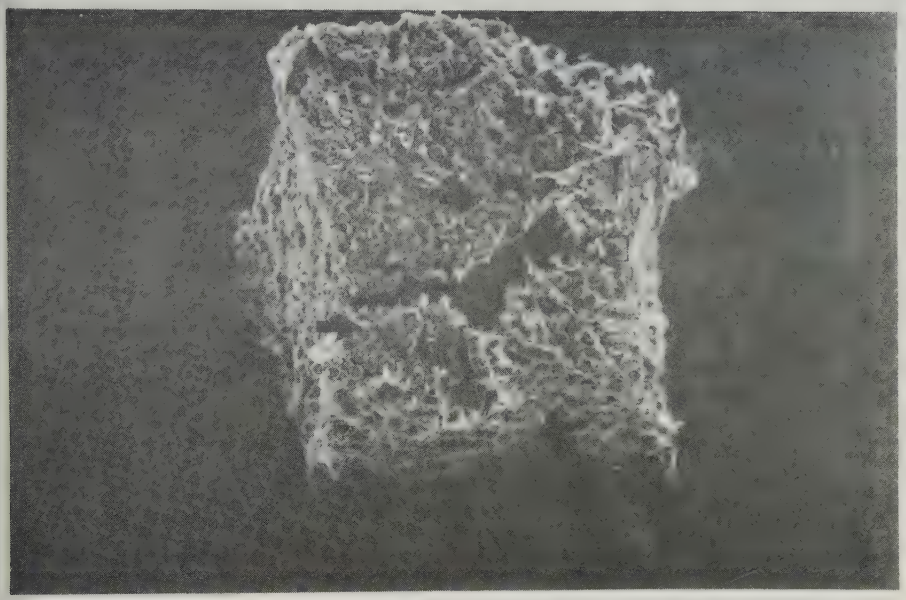
3.4.3.2 Immersionsfixierung und nachfolgende Spülung

Nach der Nierenentnahme werden die Organe in ca. 1,5 mm dicke Scheiben geschnitten und in 4%iger Formalinlösung (cacodylatgepuffert) immersionsfixiert.
Das Zerschneiden der Organe ist so durchzuführen, daß keine Quetschungen auftreten können (Abb. 5). Lassen sich diese jedoch nicht vermeiden, so sollten sie so kräftig sein, daß sie im REM als solche auch sofort erkennbar sind. Damit wird ein irrtümliches Befunden vermieden.

Anschließend werden die Scheibchen in reinem Cacodylatpuffer gespült.

3.4.3.3 Probenaufbereitung und Reinigung

Nach dem Zerteilen der Organe in Scheiben werden diese in 0,1 m-Cacodylatpuffer mit Saccharose gelegt. Unter dem Stereomikroskop erfolgt nun die diffizile Feinzergliederung.



1 mm

Abb. 5: Organblöckchen mit drei Glomerula ➡

Deutlicher Einstich mit der Präpariernadel ⇦

Es werden Blöckchen mit 1-2 mm Kantenlänge geschnitten (Abb. 5), die möglichst viele Glomerula enthalten.
Als noch schwieriger erweist sich das Herauspräparieren der einzelnen Glomerula, da sie kleiner als 0,1 mm sind. Makroskopisch sind sie gerade noch als kleiner roter Punkt erkennbar (unfixiert). Uns gelang dies nach Vorversuchen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop mittels kleinster Präpariernadeln.

Trotz Vorhandensein von Fixiermitteln sollte auf aseptische

Arbeitsbedingungen geachtet werden, da sonst im REM an den Oberflächen Bakterienkulturen gefunden werden können.

Bei der Zergliederung in der Glasschale fallen Feinstteilchen an, die die Oberfläche bedecken würden. Im Anschluß an die Probenaufbereitung muß deshalb nochmals gereinigt und gespült werden. Intensives Spülen mit Cacodylatpuffer ohne Saccharose (2 x 30 min) befreit die Oberfläche von Partikeln und Schleimen.
Andere Reinigungstechniken wie Bürsten, Pinseln oder chemische Reinigungszusätze wendeten wir nicht an (18, 33).

3.4.3.4 Nachfixierung und Nachreinigung

Nach Probenaufbereitung und Reinigung wird das Präparat mit 2% OsO_4-Lösung nachfixiert. Die Fixierlösung sollte wie bei allen Fixierungen, mindestens das 50-fache des Volumens der Probe betragen. Damit ist sichergestellt, daß das Fixans schnell und überall in der notwendigen Konzentration vorhanden ist. Je größer das Präparat, desto länger braucht das Fixans um es zu durchdringen und um so größer muß die Fixierzeit sein (bei unseren Blöckchen 2 Stunden).

Nach der Osmiumtetroxidfixierung wurden die Proben jeweils 2 x 30 min in frischer 0,1 m-Cacodylatpufferlösung mit Saccharose nachgereinigt, um das Fixans gründlich zu entfernen.

3.4.3.5 Entwässern

Nachdem die Fixierungen abgeschlossen sind müssen die Proben entwässert werden.
Würde man die Proben unmittelbar aus wässriger Lösung an der Luft trocknen lassen, wären gravierende Schäden infolge von Oberflächenspannung und Schrumpfungsprozessen zu befürchten. Deshalb wird das Wasser schrittweise durch eine aufsteigende Alkoholreihe ersetzt. Dabei werden die Proben ständig in einem Schnappdeckelgefäß in Bewegung gehalten (Tab. 4).

STUFE	AQ. DEST. : ALKOHOL (96%)	VERWEILDAUER
1	90 : 10	15 min
2	80 : 20	"
3	70 : 30	"
4	60 : 40	"
5	50 : 50	"
6	40 : 60	"
7	30 : 70	"
8	20 : 80	"
9	10 : 90	"
10	0 : 100% (absolut)	15 min x 3

Tab. 4: Entwässerungsschema

3.4.3.6 Intermedium

Einfache Lufttrocknung aus alkoholischem Medium ist aus den gleichen Gründen wie aus wässrigem Medium nicht möglich.

Es empfiehlt sich eine Trocknung mit flüssigem CO_2 (CPD). Alkohol läßt sich allerdings kaum mit flüssigem CO_2 mischen. Daher muß er noch gegen Iso-Amylacetat ausgetauscht werden (Schema Tab. 5), welches seinerseits gut mit flüssigem CO_2 mischbar ist.

STUFE	AMYLACETAT : ALKOHOL (100%)	VERWEILDAUER
1	1 Teil : 3 Teile	30 min
2	1 Teil : 1 Teil	30 min
3	3 Teile: 1 Teil	30 min
4	reines Iso-Amylacetat	30 min 2x

Tab. 5: Intermedium

Der Flüssigkeitsaustausch könnte auch mit einem Entwässerungsautomaten vorgenommen werden. Die Vorteile eines automatischen Ablaufes dieser Prozeße sind:

- große Zeitersparnis (kann auch über Nacht laufen),
- exakte Verweildauer der Proben in den Flüssigkeiten (gute Reproduzierbarkeit).

3.4.3.7 Trocknung CPD

Direkte Lufttrocknungen lieferten in Vorversuchen so schlechte Ergebnisse, daß nur nach dem "Kritischen-Punkt"-Verfahren ge-

trocknet wurde (Gerät s. Abb. 1).

Der kritische Punkt für CO_2 liegt bei 31°C (T_k) und 74 bar (P_k). Bei diesem Druck und dieser Temperatur endet die Phasengrenze flüssig/gasförmig. Erhöht man die Temperatur und den Druck über diese Werte, so werden keine Oberflächenspannungen mehr wirksam. Mann kann dann durch vorsichtige Zurücknahme von Druck und Temperatur die Probe trocknen, ohne eine Phasengrenze zu durchlaufen (18, 23, 29, 30, 32, 33). Wasser besitzt eine T_k von 374°C und einen P_k von 220 bar und ist deshalb für eine kritische Punkttrocknung von biologischen Proben ungeeignet.

Die Proben werden für die CPD in einen Käfig gebracht (Flüssigkeitsdurchfluß), der in einem kleinen Aluminiumschiffchen steht. Dabei ist ständig darauf zu achten, daß die Probe ständig benetzt bleibt (Gefahr der unbeabsichtigten Lufttrocknung). Ein Überschleusen zu großer Mengen von Intermedium ist zu vermeiden, da sonst im CPD zu oft gespült werden muß.

Vor dem Einbringen der Probe in den CPD sollte die Probenkammer auf ca. 12°C gekühlt und 2x mit Austauschflüssigkeit gespült werden.
In unserem speziellen Fall gingen wir wie folgt vor (Tab. 6):

Die Probe wird mit der günstigsten Menge an iso-Amylacetat (gerade noch bedeckt) in den Probenraum des CPD gebracht und

dicht verschlossen. Dann wird mehrmals langsam (Turbulenzen vermeiden) CO_2 eingelassen - bis zu 10x - bis das ganze Amylacetat ausgespült ist. Die Probe bleibt dabei immer benetzt. Verfügt das Gerät über genau justierbare Ein- und Auslaßventile so kann kontinuierlich gespült werden.
Anschließend wird aufgeheizt. Dabei verschwindet bei dem kritischen Punkt der Flüssigkeitsspiegel. Ist eine Temperatur von 41°C und ein Druck von ca. 90 bar (1300 psi) erreicht, so wird bei diesen Bedingungen eine halbe Stunde lang verharrt. Danach wird das CO_2 langsam über einen Zeitraum von 30 min ausgelassen. Bei zu schnellem Auslaß besteht die Möglichkeit der Rekondensation; es dürfen in der Kammer keine Nebel sichtbar werden. - Nach vollständigem Druckausgleich wird die Probe der Probenkammer entnommen.

SCHRITTE	VORGANG
1.	flüssiges CO_2 langsam einlassen,
2.	5 bis 10-mal Probenkammer spülen,
3.	Probe über Nacht in fl. CO_2 stehen lassen,
4.	Probenkammer aufheizen,
5.	30 min Wartezeit,
6.	langsames Ablassen von gasförmigen CO_2.

Tab. 6: CPD-Schema

Nach dem Trocknen sollte die Probe bald beschichtet werden, um ein Einziehen von Feuchtigkeit zu verhindern.

3.4.3.8 Präparatmontage

Nach dem Trocknen müssen die Blöckchen oder einzelne Glomerula auf dem REM-Probenhalter befestigt werden (Abb. 5).

Zuerst streicht man eine hauchdünne Schicht Leitsilber auf dem Probenteller aus und wartet bis dieses leicht angetrocknet ist. Dann werden die Präparate auf dem Probenteller mit einem feinen, leitsilbergetränkten Holzstift kontaktiert.

Ist die Leitsilberschicht zu trocken, klebt das Präparat nicht, ist sie zu feucht, besteht die Gefahr, daß das Leitsilber über die Oberflächenkanten zieht.

3.4.3.9 Herstellen der Leitfähigkeit

Die nichtleitenden Oberflächen der Proben müssen bedampft oder besputtert werden. Hierfür wurde Gold gewählt, da andere Materialien nicht so gute Ergebnisse lieferten.

Da in der ersten Zeit der Versuchsdurchführung nur eine Bedampfungsanlage zur Verfügung stand, wurden zunächst Versuche mit verschiedenen Aufdampfschichten von 100 bis 600 nm Dicke durchgeführt.

Später stand eine eigene Sputteranlage (Abb. 4) zur Verfügung, die auf Anhieb gute Resultate lieferte (19). Zudem war der apperative Aufwand hierbei geringer, die Beschichtungen schneller, so daß später die Proben nur noch besputtert wurden.

Anschließend bewahrte man die Proben im Exsikkator auf. Auch nach Monaten zeigten sie ein unveränderters Aussehen.

3.4.4 REM-Aufnahmetechnik (Mikroskopiertechnik)

Justierungen am REM: Am gereinigten REM wurde zuerst eine mechanische Zentrierung von Kathode und Blenden vorgenommen. Mangelnde Sorgfalt dabei führt - wie sich während der Aufnahmen zu dieser Arbeit zeigte - zu verschlechteter Bildqualität, welche elektronisch nicht korrigiert werden kann.

Danach erfolgte eine präzise elektronische Zentrierung der elektromagnetischen Blenden sowie der (x,y)-Strahlverschiebung (Shift). Kathodenheizung und Wehneltspannung wurden auf einen Emissionstrom von 50 µA bei 20 kV Beschleunigungsspannung eingestellt. Die Durchmesser der Wehnelt-, Objektiv- und Aperturblende betrug in dieser Reihenfolge 300, 300 und 100 µm.

Ziel dieser Bemühungen war, bei hohem Auflösungsvermögen ein gutes Signal/Rauschverhältnis des Detektors zu erhalten.
Bei der Probensichtung wurde die Hauptebene der Probenoberfläche immer 30° gegen den Primärstrahl in Richtung Kollektor geneigt.
Zu hohe thermische Belastung läßt sich durch kurze Verweildauer des Elektronenstrahls auf kleinen Arealen verhindern. Außerdem verringert sich so auch die Gefahr von Kohlekontaminationsfeldern. Da das Leitz AMR 1000 als Sonderausstattung eine Turbomolekularpumpe (20) hat, traten Kontaminationsfelder erst bei sehr langen Rasterzeiten auf.

Aufladungseffekte (helle Punkte und Streifen) sind elektronisch nicht zu eliminieren, lassen sich aber durch gute Beschichtung vermeiden.

Probensichtung: Die Notwendigkeit einer rationellen Probensichtung ergab sich schon aus der Fülle des Untersuchungsgutes: 180 Nierenblöckchen mit ca. 1000 Glomerula, zusätzlich einzeln präparierte Glomerula.

Nach Groborientierung über das gesamte Nierenblöckchen bei niedriger Vergrößerungsstufe wurde die Probe in 400-facher Vergrößerung systematisch abgesucht und die Koordinaten der Glomerula (5 bis 8 Glomerula pro Blöckchen) festgehalten.
Dann wurden sie einzelnen angefahren und in 1200-, 2400-, 6000-, 12000- und 24000-facher Vergrößerung eingehend untersucht.
Man versuchte zuerst alle Glomerula einer Maus zu sichten und die repräsentativen fotographisch zu dokumentieren.
Ein nachleuchtender Bildschirm (Bilddurchlauf 1,3 sec/Bild) ermöglichte die Betrachtung der Probenbildes.

Dokumentation (Fotographische Technik): Zur bildmäßigen Dokumentation stand ein separater Aufnahmebildschirm mit Leitz Kameraansatz (Photarobjektiv 4,5/80 mm) zur Verfügung, zusätzlich eine Polaroid Planfilmkassette (4x5 inch) und eine Linhoff Rollfilmkassette (56x72 mm). Da vom Gerät ein Anschluß dieser Rollfilmkassette nicht vorgesehen war, mußte die (x,y)-Auslenkung des Aufnahmebildschirmes selber angepaßt

werden. Es wurden deshalb zwei Festpotentiometer abschaltbar in das Gerät integriert. Mit deren Hilfe konnte das Aufnahmebild dem Format der Rollfilmkassette angepaßt werden.

Alle Aufnahmen wurden auf Ilford HP 5 Rollfilm gefertigt und mit Tetenal Neofin blau entwickelt.

Wertvolle Hilfe zu Steuerung des Bildkontrastes war der eigens angeschaffte nichtlineare Gammaverstärker der Firma Leitz (27).

3.4.5 Quantitative Auswertung der REM-Aufnahmen

Zur Quantifizierung der Veränderung der Podozyten im Glomerulum erprobten wir mehrere Verfahren. Reproduzierbare Ergebnisse lieferte eine Meßmethode, bei welcher über Aufnahmen gleicher Vergrößerungsstufe ein geeignetes Meßraster (Strichplatte) projiziert und ausgezählt wurde, wieviel Kreuzungspunkte des Meßrasters auf Podozytenspalten treffen.

Hierzu wurde eine Vergrößerungsstufe gewählt (6000-fach), bei der die Podozytenspalten gut sichtbar und das Meßraster nur über Podozytenverzahnungen lag (Meßfläche 4 x 4 µm). REM-Aufnahmen dieser Vergrößerungsstufe wurden unter ein Stereomikroskop mit 10er Okular und Weitwinkelvorsatz (0,4x) gelegt, um eventuell vorhandene kleine Differenzen im Vergrößerungsmaßstab der Aufnahme mit der Zoomoptik des Stereomikroskopes auszugleichen.

Im Okular befand sich eine Strichplatte mit 400 Kreuzungspunkten. Kreuzungspunkte, die über einer Podozytenspalte lagen, wurden gezählt. Das Verhältnis dieser Punkte zu der gesamten Punktzahl ist ein Maß für die noch offenen Podozytenspalten. Wachsen diese während des Versuchs zu (z.B. durch Verschmelzen der Podozyten), so nimmt der Quotient Punkte über Spalten/ Gesamtpunktzahl zwangsläufig ab.

4 ERGEBNISSE

4.1 Methodik

4.1.1 Präparation

Stabilisieren: Die dreigliedrige Stabilisierung - Perfusions-Fixierung, Immersionsfixierung, Osmiumtetroxidnachfixierung - ergab gute Resultate.
Abweichungen von dieser Triade verschlechterten meist das Ergebnis. Messungen im Stereomikroskop bewiesen, daß Zellschrumpfungen und -schwellungen sich im Rahmen hielten (kleiner 10% linear).
Deshalb erachteten wir es nicht für notwendig, vor der Perfusionsfixierung eine verbesserte isoionische Kochsalzlösung zur Spülung zu verwenden, wie sie von manchen Autoren vorgeschlagen wird.

Im Gegensatz zu Literaturangaben (18, 32) verbesserten OsO_4-Räucherungen zusätzlich oder anstelle von Oso_4-Fixierlösungen, das Präparationsergebnis nicht. Vielmehr hatte man den Eindruck, daß sich die Auflösung dieser Proben verschlechterte.

Eine Veränderung der Konzentrationen der Fixiermittel führte

ebenfalls zu keiner signifikanten Verbesserung der Präparation. Fixationsgemische (wie z.B. Glutaraldehyd/Formalin) brachten zwar keine Verschlechterungen aber auch keine Vorteile.

Pathologisches und gesundes Nierengewebe zeigten identisches Verhalten gegenüber Fixiermitteln, was nicht ohne weiteres zu erwarten war.
Proben, die nach Osmiumtetroxid-Fixierung und Trocknen zerbrochen wurden, zerfielen interzellular.

Trocknen: Wesentliche Schrumpfungen infolge Lipidextraktion (Alkohol) traten nicht ein. Die Kantenlänge eines Präparateblöckchens - vor und nach dem Trocknen gemessen - ergab Längenverminderungen zwischen 2% und 8%. Auf einen Wechsel des Entwässerungsmittels konnte deshalb verzichtet werden.

Eine wesentliche Vereinfachung des Entwässerungsverfahrens ohne Minderung der Ergebnisse erzielt man, indem man die Entwässerung mit 50% Alkohol - anstatt wie üblich mit 10% - begann und dann die Probe über Nacht in 70% Äthanol beließ und am nächsten Tag mit 80% usw. den Wassertausch beendete.

Eine Verkürzung des Trocknungsprozesses im CPD machte sich sofort durch schlechtere Präparate bemerkbar und sollte unterlassen werden.

Herstellen der Leitfähigkeit: Leit-C nach Göcke erwies sich für unsere Proben als ungeeignet. Daher befestigten wir alle Proben mit Leitsilber.
Ein um die Proben gezogener Ring von Leitsilber verbesserte die Ableitung der Elektronen und verhütete eventuelle Aufladungen.

Goldbedampfte und -besputterte Schichten brachten die besten Auflösungen. Es wurden Versuche mit Aufdampfschichten von 100 bis 600 nm durchgeführt. Dabei lieferten, in Übereinstimmung mit Rosenbauer (33) kegelbedampfte Schichten mit 150 bis 250 nm die besten Abbildungen.

Mit dem Sputtergerät wurden Schichtdicken von ca. 40 nm (180 sec Sputterzeit) aufgebracht, die hervorragende Leitfähigkeit und Auflösungen zeigten. Da dabei die thermische Belastung der Präparate erheblich geringer als beim Aufdampfverfahren war, wurde das Besputtern diesem vorgezogen.

4.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Technik

Geräteparameter: Erhöhungen oder Erniedrigungen der Beschleunigungsspannung von 20 kV oder des Emissionstromes von 50 µA wirkten sich negativ auf das Abbildungsverhalten aus.
Eine 50 µm Endaperturblende, die theoretisch ein noch besseres Auflösungsvermögen liefern sollte, erfüllte diese Ansprüche nicht.
Ebenso zeigten teuerere Spitzenkathoden anstelle der im Routinebetrieb verwendeten Haarnadelkathoden ein schlechteres Bild.
Die höchste verwertbare Vergrößerungsstufe lag im Normalbetrieb bei ca. 30 000 : 1. Mögliche noch höhere elektronische Vergrößerungen bewirkten lediglich eine Verstärkung der Unschärfen.

Das REM mußte jede Woche (nach 20 bis 30 Betriebsstunden) gereinigt werden, um die für die Aufnahmen notwendige hohe Auflösung kontinuierlich zu gewährleisten (Feinstveränderungen im glomerulären Bereich erforderten einen Vergrößerungsmaßstab von 24 000 : 1).

Aufnahmetechnik: 300 Aufnahmen auf Rollfilm 120 wurden erstellt. Dafür eignete sich die Kombination von hochempfindlichem S/W-Negativfilm HP 5 und besonders weich und scharf

arbeitendem Neofin blau Entwickler am besten. Versuche, die Aufnahmequalität durch Film-, Format- oder Entwicklerwechsel zu steigern, schlugen fehl. Dies ist bezüglich der Abbildungsschärfe verständlich, da der Aufnahmebildschirm nur ca. 50 Linien (Abtastrate 5) pro mm auflöst und die hochempfindlichen Filme bereits ein Auflösungsvermögen von etwa 80 Linien besitzen.

Die Positivverarbeitung erfolgte mit Ilfospeed-Papier und -chemikalien. Der Leitz-Focomat-Vergrößerer erlaubte schnelle und gute Handabzüge.

Trotz weich arbeitendem Film und Entwickler war es oft notwendig, den Bildschirmkontrast mit dem Leitz-Gammaverstärker abzuschwächen, um so zu normal kontrastierten Aufnahmen zu kommen (27).

4.2 Untersuchung der Ausscheidungsfunktion

Volumen: Wie aus Abb. 6 zu ersehen, bleibt die tägliche ausgeschiedene Urinmenge der Versuchsmäuse in den ersten 5 Wochen nahezu konstant. Allenfalls deutet sich von der 3. zur 5. Woche ein leichter Anstieg an. In der 5. bis 7. Woche findet dann eine wesentliche Erhöhung des Urinvolumen statt. Es steigt von ca. 1,6 ml auf 4,4 ml, was eine Steigerung von nahezu 200% bedeutet. Von der 7. bis zur 9. Woche bleibt sie dann auf diesem Niveau, um in der letzten Woche nochmals anzusteigen (auf absolut 6 ml, damit Vervierfachung der Anfangsmenge).

Protein: Die Proteinausscheidung zeigt ein ähnliches Bild: In den ersten drei Wochen bemerkt man keine signifikante Veränderung (bis auf einen leichten Abfall in der 3. Woche). Von der 4. bis 7. Woche nimmt die Proteinausscheidung auf etwa das Doppelte des Ausgangswertes zu. Um diesen in der 7. Woche erreichten Wert (ca. 150 mg pro Tag) schwankt sie dann im restlichen Versuchszeitraum.

Das Urinvolumen vervierfacht sich, wohingegen die Proteinausscheidung sich nur verdoppelt. Also muß sich die Proteinkonzentration des Harns während des Versuchs halbiert haben. Dies war bereits bei den photometrischen Extinktionsmessungen beobachtet worden. Bei gleichem Volumen nahm die Extinktion durchschnittlich auf die Hälfte ab.

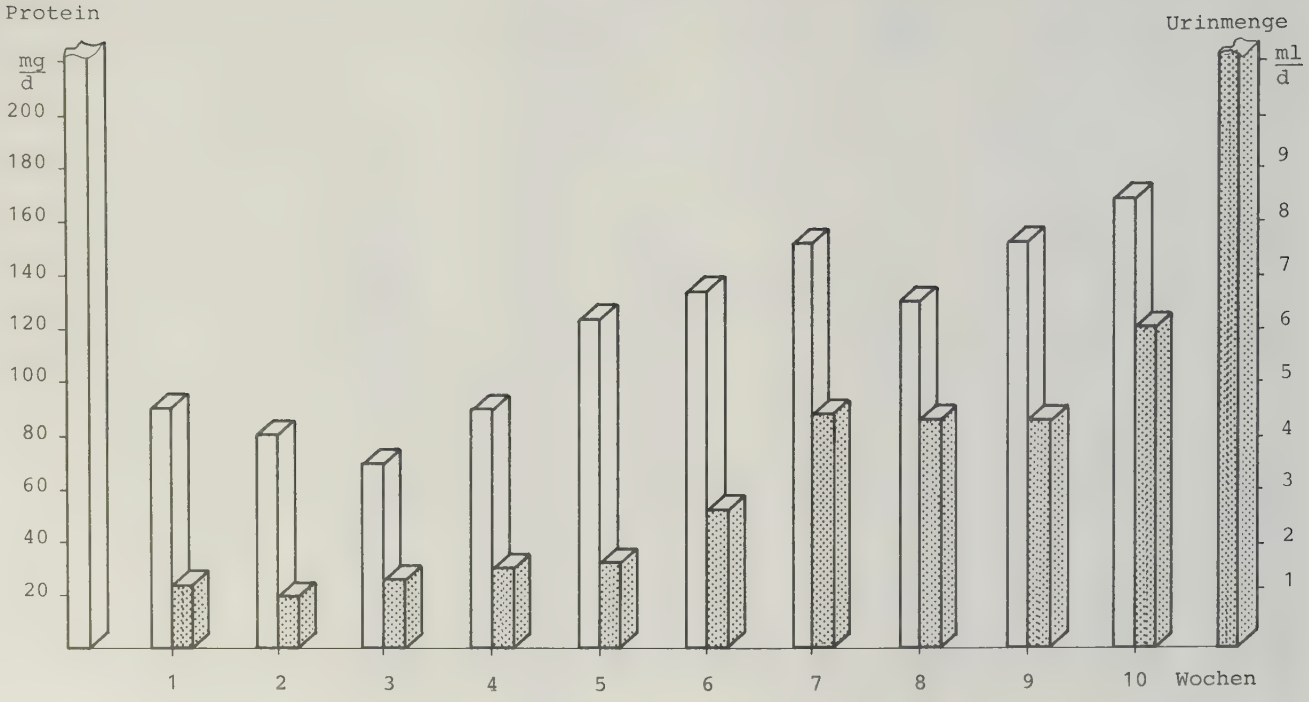


Abb. 6 Urin- und Proteinausscheidung während des Versuchs

4.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von Milz und Niere

Die Amyloidose befällt zunächst die Milz bevor sie auf die Niere übergreift (Tab. 7).

Histologische Befunde der

Gruppe 1: Milz - leichte Amyloidose bei 3 Mäusen; vermutlich spontan infolge genetisch bedingter Disposition des Versuchstierstammes,
- perifollikulär, unscharf begrenzter Amyloidsaum.

Niere - keine Amyloidablagerungen (Glomerula, Tubuli, Nierengefäße amyloidfrei).

Gruppe 2: Milz - mittelschwere Amyloidose bei 3 Mäusen,
- perifollikulär, unscharf begrenzter Amyloidsaum.

Niere - leichte Amyloidose bei einer Maus, die Kongofärbung ist innerhalb der Glomerula fraglich positiv,
- diskrete, streifenförmige Amyloidablagerung im Interstitium, besonders im Nierenmark.

Gruppe 3: Milz - unterschiedlich schwer ausgeprägte Amyloidose bei allen Mäusen,
- perifollikulärer Amyloidsaum,
- beginnende diffuse Durchsetzung der gesamten weißen Pulpa mit Amyloid (1 Maus).

Niere - keine Amyloidose (weder glomerulär noch interstitiell).

Gruppe 4: Milz - mittelschwere bis schwere Amyloidose bei 4 Mäusen,
- perifollikulär mit Übergreifen auf die Restpulpa.

Niere - Amyloidose bei einer Maus,
- positive Amyloidreaktion in Glomerula und besonders im Bereich des Mesangiums.

Gruppe 5: Milz - schwere Amyloidose bei allen 5 Mäusen,
- diffuse Durchsetzung der ganzen Milzstruktur,
- partielle Zerstörung der Lymphfollikel,
- Verdrängung ortsständiger Zellen durch Amyloidinfiltration.

Niere - Amyloidose bei allen Mäusen,
- geringe bis mittlere Amyloidablagerung in Glomerula, besonders im Mesangium; weniger im Nierenmark und -rinde.

Gruppe 0: Milz - mittelschwere Amyloidose bei 2 Mäusen,
- perifollikulärer Amyloidsaum,

Niere - geringgradige bis mittelschwere Amyloidose bei einer Maus,
- glomeruläre Amyloidablagerung im Mesangium.

Die Disposition dieses Mäusestammes zur Amyloidose geht aus dem Milzbefall der nicht oder kaum behandelten Gruppen hervor. Die gleich alten Mäuse der Gruppe 0 zeigen nur in einem Fall einen geringgradigen bis mittelschweren Befall der Glomerula der Niere.
Eindrucksmäßig scheint sowohl Häufigkeit als auch Grad des Milzbefalls proportional zur Gesamtdosis des Caseins zu sein. Dies gilt auch für die Amyloidose der Niere, die nur in Gruppe 5 in leichter bis mittelschwerer Ausprägung vorhanden war.
Je schwerer die Milz in den einzelnen Gruppen betroffen war, desto häufiger und schwerer schien die Niere in Mitleidenschaft gezogen worden zu sein. Das Übergreifen der Amyloidose auf die Nieren könnte hier im Sinne eines Überlaufphänomens bei schwerem Milzbefall aufgefaßt werden.

Zwischen dem Grad der interstitiellen Amyloidablagerung in der Nierenrinde, bzw. im Nierenmark und den glomerulären Amyloidablagerungen ließ sich kein Zusammenhang nachweisen.

GRUPPE	WOCHE-INJ.	MAUS NR.:	A M Y L O I D Milz / Niere
1	3 ≙ 15	M 1 M 2 M 3 M 4 M 5*	- / - ++ / - ++ / - + / -
2	4 ≙ 20	M 6 M 7 M 8 M 9 M 10	++ / - +++ / - - / - - / - ++ /(+)
3	5 ≙ 25	M 11 M 12 M 13 M 14 M 15	+ / - + / - ++ / - + / - +++ / -
4	6 ≙ 30	M 16 M 17 M 18 M 19 M 20	+++ / - +++ / - - / - +++ / - ++ / + (+)
5 a b c	8 ≙ 40 9 ≙ 45 10 ≙ 50	M 21 M 22 M 23 M 24 M 25	+++ /(+) +++ / + +++ / + ++++ / ++ ++++ / ++
0 Kontrollgruppe -keine Injektionen-		M 26 M 27 M 28 M 29 M 30	+++ / ++ ++ / - - / - - / - - / -

Tab. 7: Lichtmikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte

*) M 5 durch Einwirkung anderer Mäuse vorzeitig verstorben.

4.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Nierenglomerula

Rasterelektronenmikroskopisch untersucht und dargestellt wurden die Podozyten (Deckzellen) der Glomerula. Zusätzlich ist bei Gruppe 1 und 5 das gefensterte Endothelrohr einer eröffneten Glomerulumkapillare abgebildet.

Beschrieben werden die Veränderungen der Podozyten, deren (s. Abb. 9)

Füßchen, welche ihrerseits aus den Hauptfortsätzen des Podozytenleibes abzweigen, die Glomerulumkapillaren umschlingen.

Auf Abbildungen der Gruppe 0 (Kontrollgruppe) wurde verzichtet, weil sie weitgehend denen der Gruppe 1 und 2 entsprachen.

Rasterelektronenmikroskopische Befunde:

GRUPPE 1:

Versuchsdauer : 3 Wochen

Injektionen : 15

Abb. 10-13 von : M 2

Verzahnung : regelrecht ausgebildet (Abb. 10, 11)

Füßchen : schlank, langfingerig, glatt (Abb. 9, 10, 11)

Hauptfortsätze : regelmäßig (Abb. 9, 11)

Podozytenleib : glatt, regelmäßig (Abb. 8, 9)

"Mikrovilli" : schlank, unterschiedlich lang (Abb. 9, 10)

Endothelfensterung: normal (Abb. 12, 13).

Anmerkung: Noch keine pathologischen Veränderungen an den Glomerula erkennbar.

Abb. 4

10 µm

Abb. 3

10 µm

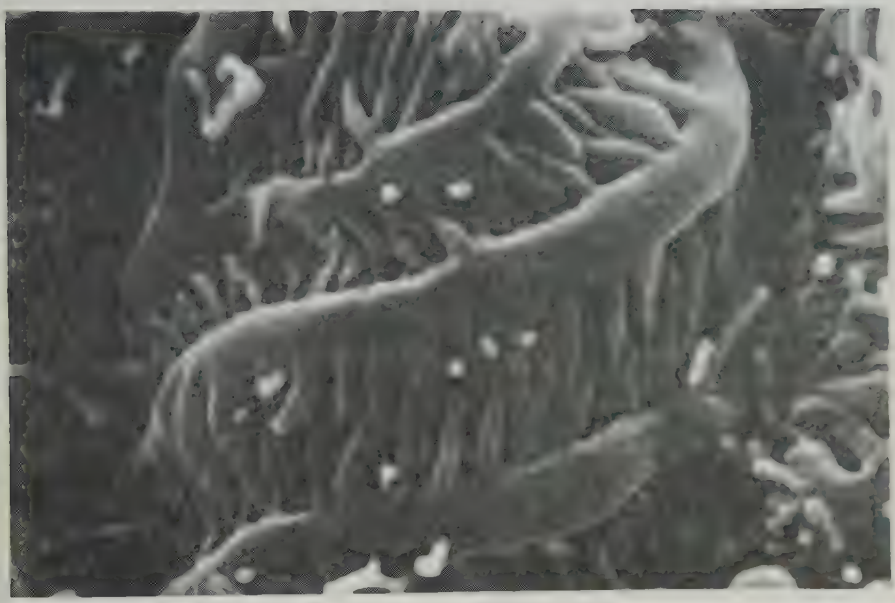


Abb. 10

1 µm

Abb. 11

1 µm

Abb. 12

1 µm

Abb. 13

1 µm

GRUPPE 2:

Versuchsdauer : 4 Wochen
Injektionen : 20
Abb. 14 - 17 von : Maus 6

Verzahnung : weitgehend normal (Abb. 15)
Füßchen : in der Mehrzahl schlank und langfingerig; vereinzelt etwas verdickt (Abb. 16, 17)
Hauptfortsätze : glatt, normale Oberfläche
Podozytenleib : regelmäßig
"Mikrovilli" : im Bereich der Hauptfortsätze der Podozyten etwas verplumpt und verkürzt.

Anmerkung: Gruppe 2 zeigt erste pathologische Veränderungen (Füßchen, "Mikrovilli") in den Glomerula.

Abb. 14

10 µm

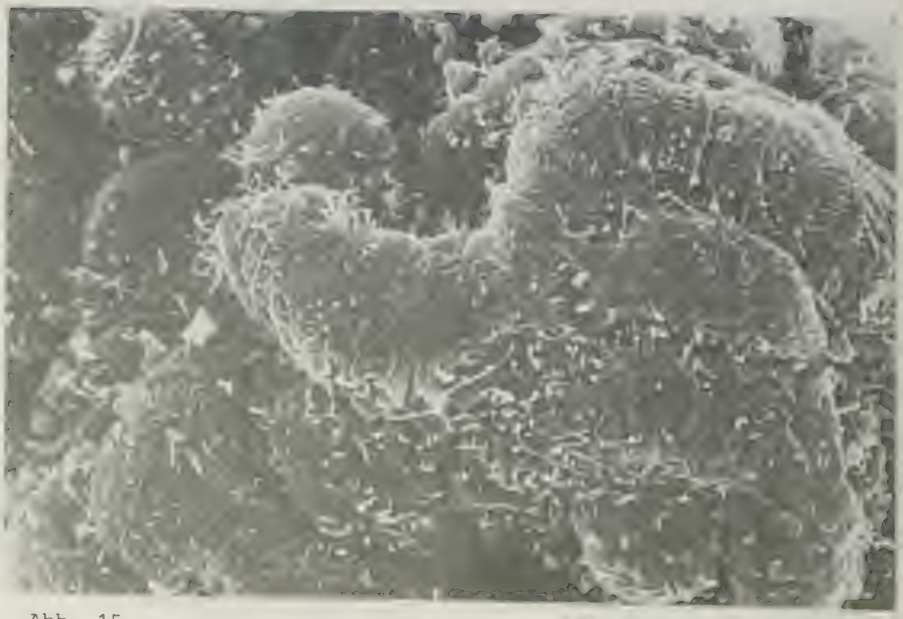


Abb. 15

10 µm

Abb. 16

1 µm

Abb. 17

1 µm

GRUPPE 3:

Versuchsdauer	: 5 Wochen
Injektionen	: 25
Abb. 18-25 von	: Maus 13
Verzahnung	: weitgehend gut ausgebildet (Abb. 18, 19, 21)
Füßchen	: stellenweise Verkürzungen und Verplumpungen (Abb. 20, 22, 23, 24, 25)
Hauptfortsätze	: ebenmäßig und regelrecht (Abb. 18, 19, 20)
Podozytenleib	: normal strukturiert
"Mikrovilli"	: scheinen insgesamt verkürzt und verplumpt (Abb. 20).

Anmerkung: Das Aussehen dieser Gruppe ähnelt dem der Gruppe 2. Die Strukturveränderungen waren nicht gleichmäßig bei allen Glomerula (wie auch in den anderen Gruppen), einzelne konnten einen völlig regelrechten Strukturaufbau zeigen.

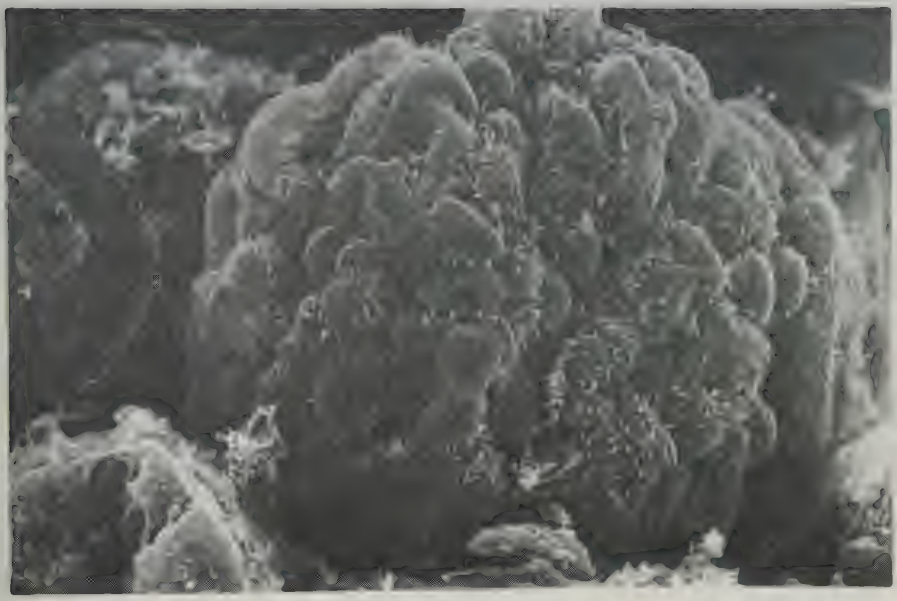


Abb. 18

10 µm

Abb. 19

10 µm

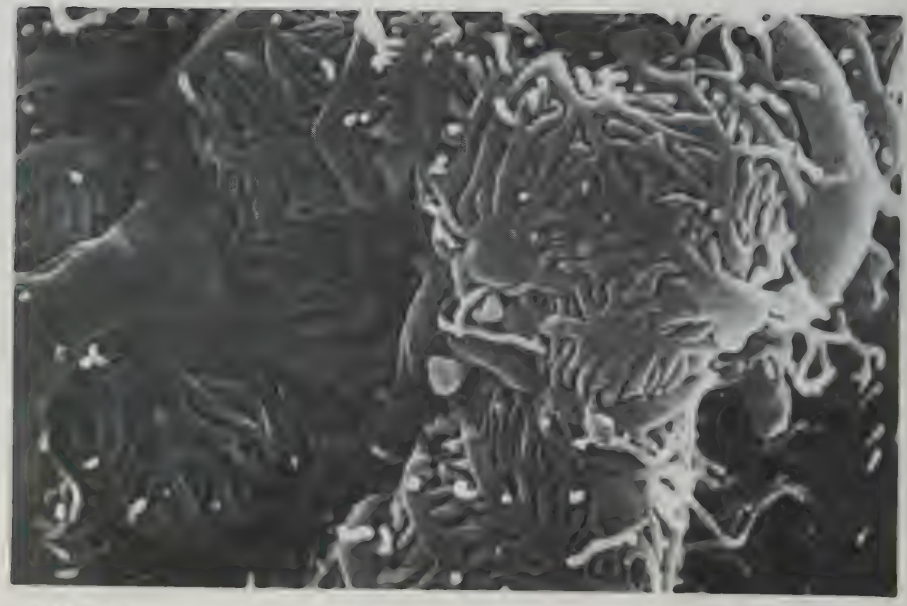
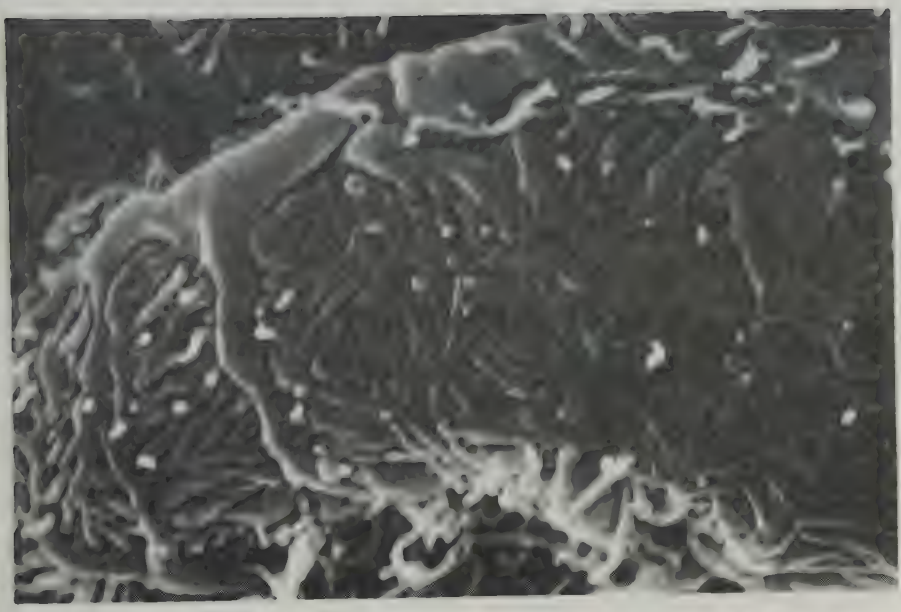


Abb. 20

1 µm

Abb. 21

1 µm



1 µm

Abb. 22

1 µm

Abb. 23

Bild 24

1 µm

Bild 25

1 µm

GRUPPE 4:

Versuchsdauer	: 6 Wochen
Injektionen	: 30
Abb. 26-33 von	: Maus 20
Verzahnung	: in manchen Arealen unregelmäßig (Abb. 26, 27, 29)
Füßchen	: deutlich verplumpt, verkürzt und z.T. retrahiert (Abb. 29, 30, 31)
Hauptfortsätze	: flächenhaft verbreitert (Abb. 29, 31)
Podozytenleib	: Höckerung der Oberfläche (Abb. 32, 33)
"Mikrovilli"	: stark reduziert und verplumpt (Abb. 26, 27 32, 33).

Anmerkung: Deutliche Zunahme der glomerulären Strukturdefekte (Befall der Hauptfortsätze und des Podozytenleibes). Trotzdem noch einzelne Glomerula mit geringen oder keinen Veränderungen.

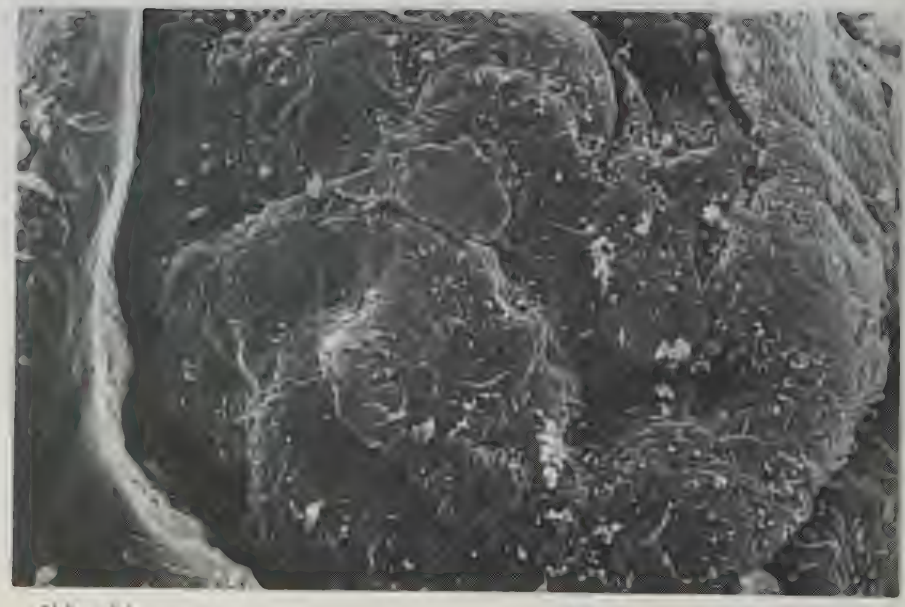


Abb. 26 10 µm

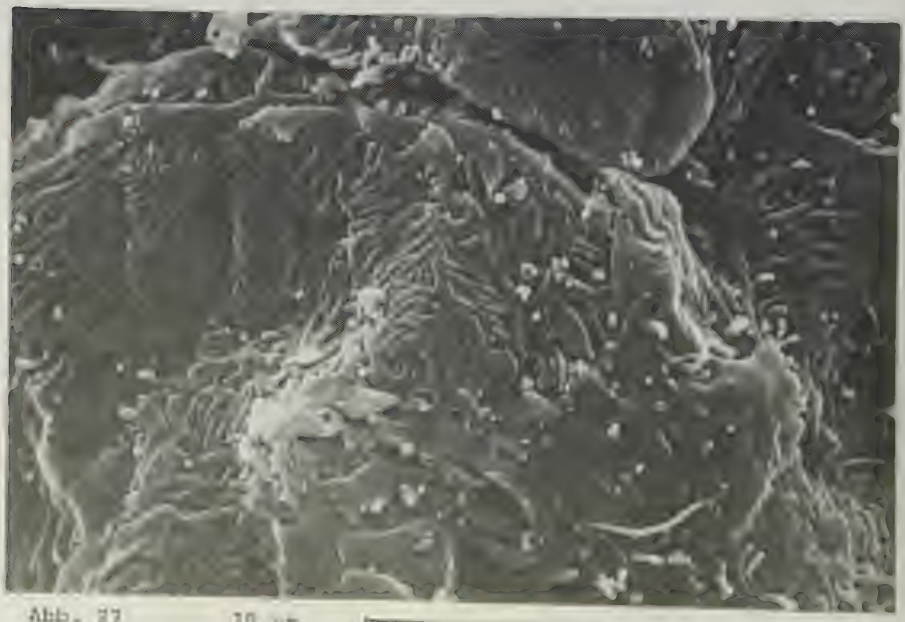


Abb. 27 10 µm

Abb. 28

1 µm

Abb. 29

1 µm

Abb. 30

1 µm

Abb. 31

1 µm

Abb. 32 1 µm

Abb. 33 1 µm

GRUPPE 5:

Versuchsdauer	: 8 (a), 9 (b) und 10 (c) Wochen
Injektionen	: 40 " , 45 " und 50 "
Abb. 34-39 von	: Maus 21 (8 Wochen)
" 40-47 von	: Maus 22 (9 Wochen)
" 48-59 von	: Maus 24 (10 Wochen)

Verzahnung	: nicht oder nur noch teilweise vorhanden (Abb. 36, 37, 41, 42)
Füßchen	: in größeren Arealen verplumpt und retrahiert (Abb. 36, 37, 38 (!))
Hauptfortsätze	: stark verbreitert und unregelmäßig strukturiert (nekrotische Prozesse), fetzige Cytoplasmaablösungen (Abb. 44, 45)
Podozytenleib	: höckerig, nekrotisch (Abb. 56, 57)
"Mikrovilli"	: extrem kurz, plump, herdförmig zerfallen (Abb. 41, 42, 55, 57).

Anmerkung: Die glomerulären Deckzellen der Gruppe 5 mit 8 - 10 Wochen Caseininjektionen zeigen zum Teil schwerste Strukturdefekte. Nekroseähnliche Prozesse zerstören die Podozyten, Teile der Deckzelloberfläche platzen auf.

Die Endothelauskleidung eröffneter glomerulärer Kapillaren (Abb. 46, 47) war stark unregelmäßig mit unterschiedlich großer Fenestrierung. Das Zytoplasma der Endothelzellen selbst erschien z.T. "bröcklig nekrotisch". Abschnittweise

war die Fenestrierung sogar völlig aufgehoben.

Die Abbildungen 58 und 59 zeigen einen Schnitt durch das Glomerulum der Maus (aufgenommen mit dem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM 9). Deutlich sind die subendothelialen Amyloidablagerungen erkennbar (⟶).

Abb. 34

10 µm

Abb. 35 10 µm

Abb. 36

1 µm

Abb. 37

1 µm

Abb. 38 1 µm

Abb. 39 (80000:1) 1 µm

Abb. 40 10 µm

Abb. 41 1 µm

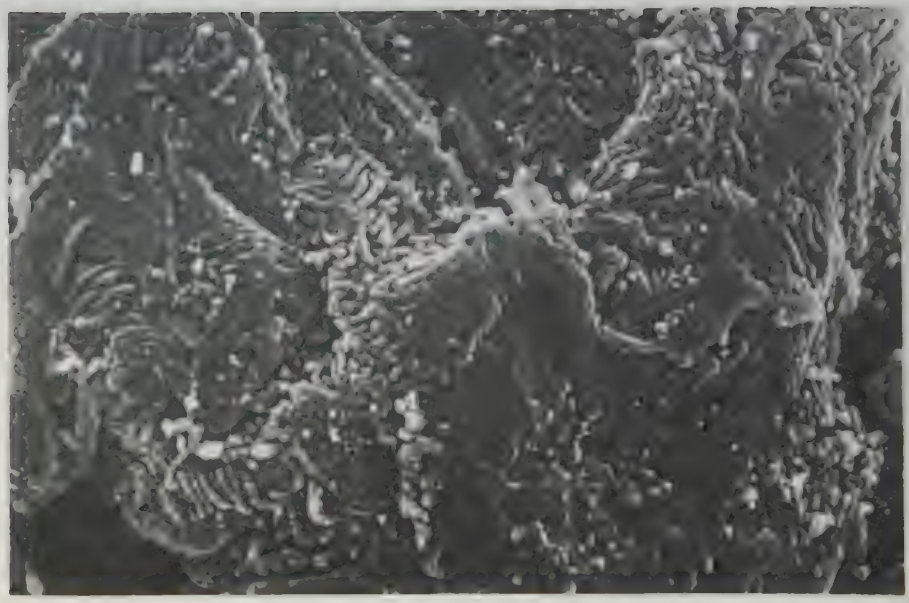


Abb. 42

1 µm

Abb. 43

1 µm

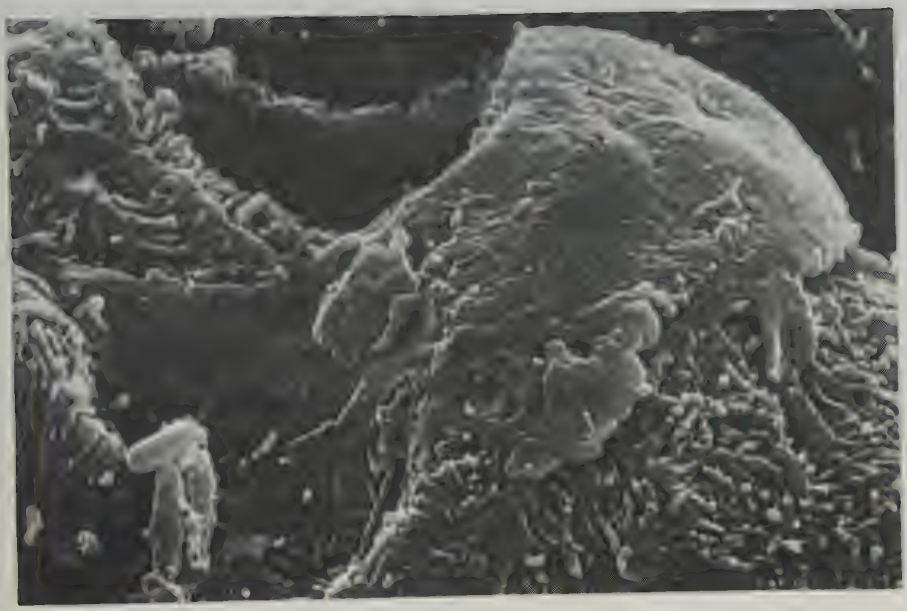


Abb. 44

1 µm

Abb. 45

1 µm

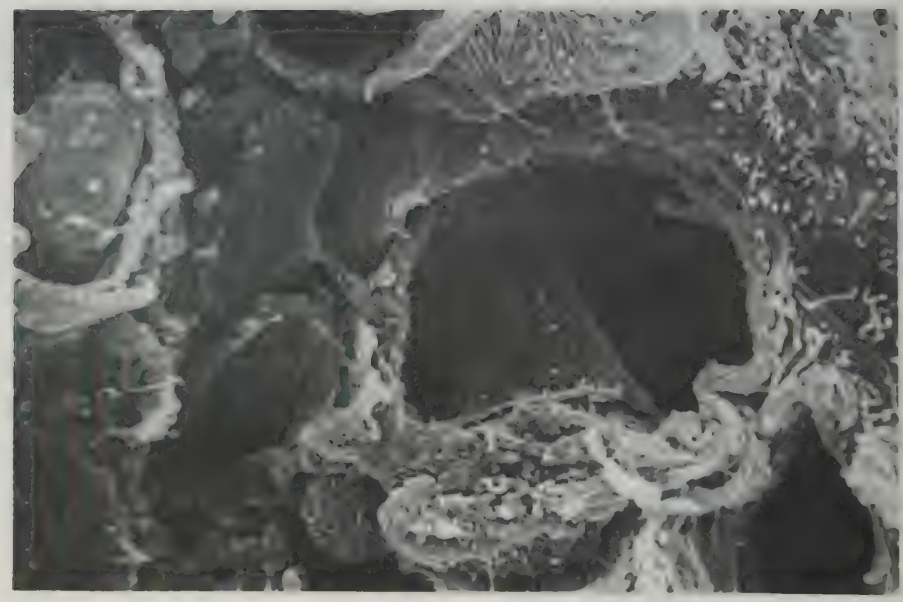


Abb. 46

1 µm

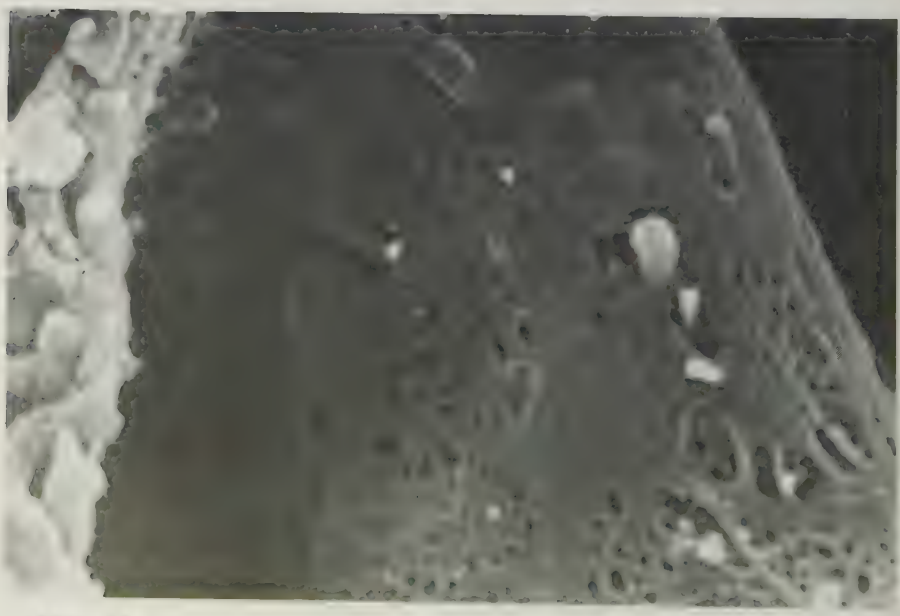


Abb. 47

1 µm

Abb. 48

10 µm

Abb. 49

10 µm

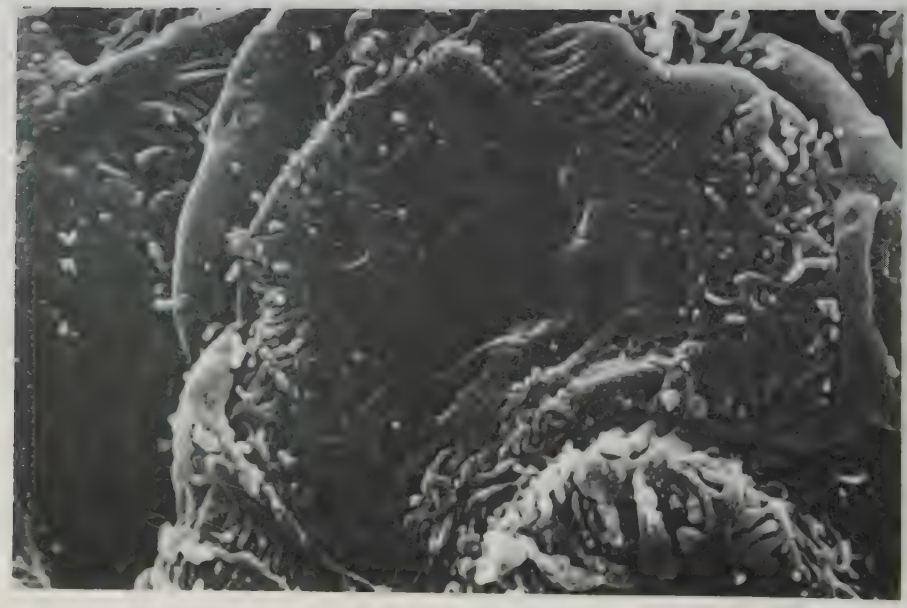


Abb. 50

1 µm

Abb. 51

1 µm

Abb. 52

10 µm

Abb. 53

10 µm

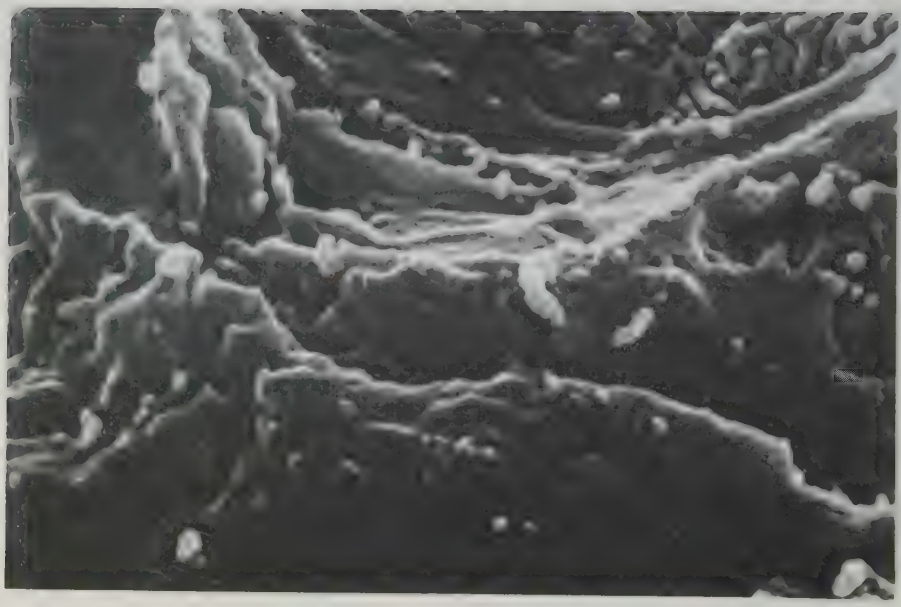


Abb. 54

1 µm

Abb. 55

1 µm

Abb. 56

1 µm

Abb. 57

1 µm

Abb. 58 TEM-Aufnahme "durch" das Glomerulum (Maus) 1 µm

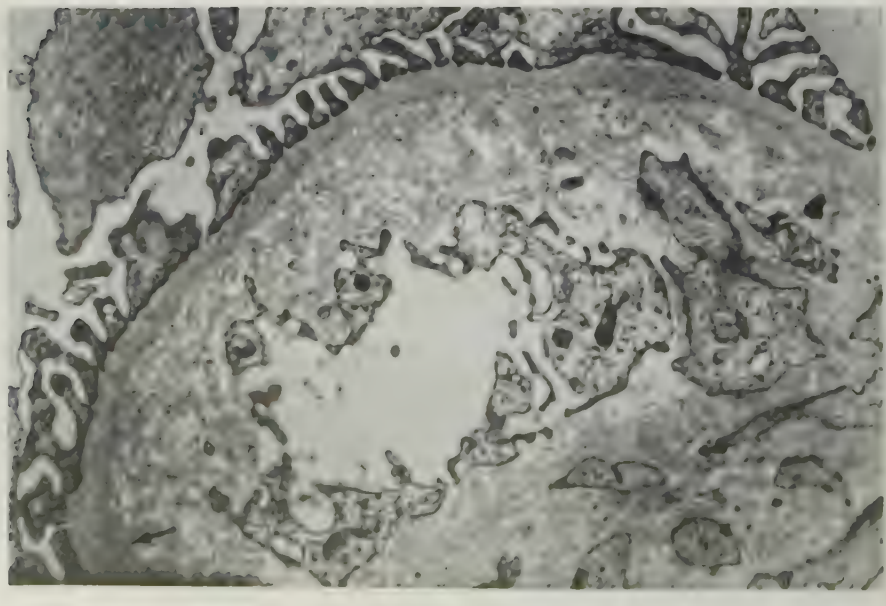


Abb. 59 (wie oben) 1 µm

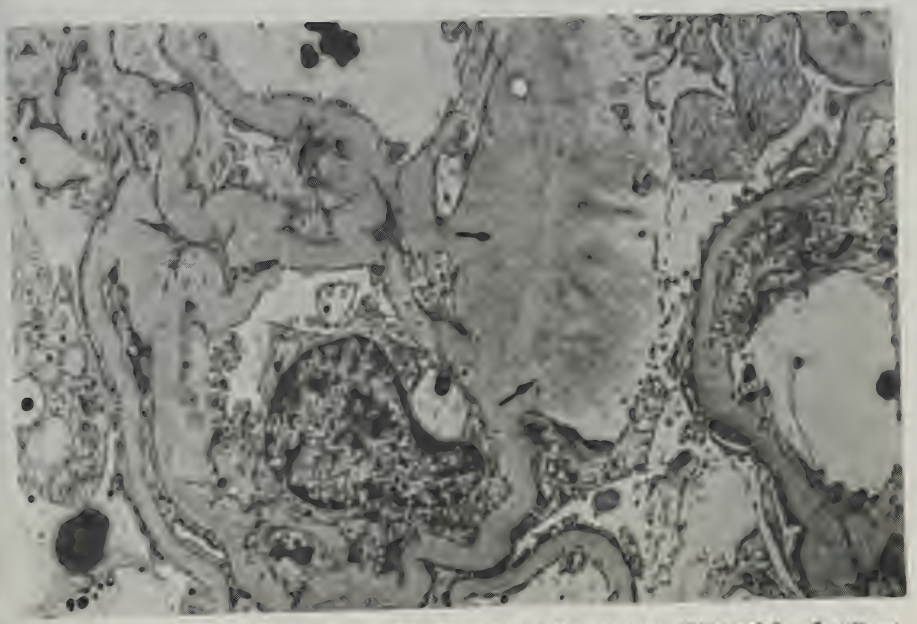
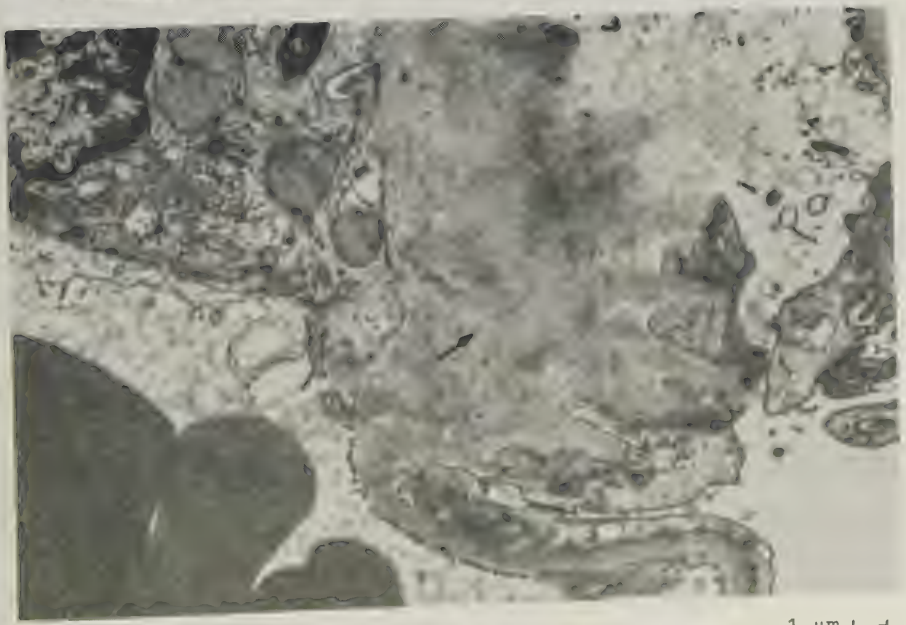


Abb. 60a Glomerulum mit Amyloidablagerung (Mensch) 1 µm



1 µm

Abb. 60b (wie oben)

4.5 Semiquantitative Auswertung der REM-Aufnahmen

Anhand der in 3.4.5 beschriebenen Methode wurden die Podozytenspalten untersucht.
Mit zunehmender Versuchsdauer retrahieren und verdicken sich die Podozytenfüßchen. Die Folge ist eine Abnahme der Filtrationsschlitze.

Bei gesunden Mäusen lassen sich etwa 35% der Meßpunkte in Filtrationsschlitze (Spalten) projizieren, bei kranken sinkt die Zahl je nach Schwere der Erkrankung (s. Abb. 7), bis schließlich im Endstadium keine mehr vorhanden sind.

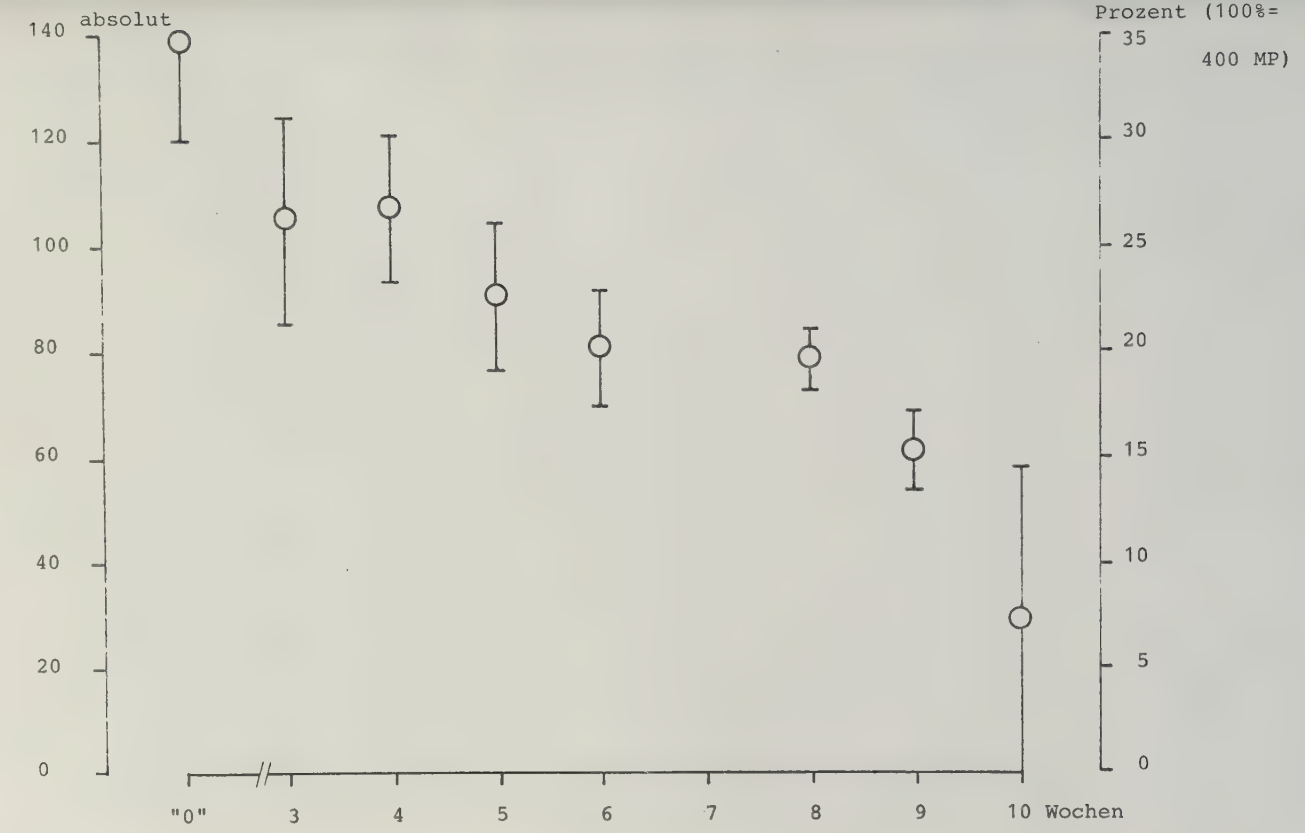


Abb. 7: Meßpunkte, die auf Filtrationsschlitze treffen

5 DISKUSSION

Der für die vorliegende Untersuchung verwendete Mäusestamm (C 57 BL 6 J) ist für das Studium morphologischer und funktioneller Organveränderungen bei sich entwickelnder Amyloidose besonders geeignet, da die männlichen Tiere in einem hohen Prozentsatz bereits in den ersten Lebensmonaten eine spontane Amyloidose entwickeln. Durch zusätzliche subcutane Caseininjektionen läßt sich bei den männlichen Tieren die Inzidenz der Amyloidose auf 100% steigern. Die Amyloidentwicklung beginnt in der Milz und greift sekundär mit einer zeitlichen Verzögerung auf Leber und Niere über.

In der Niere beginnen Amyloidbildung und Amyloidablagerung unabhängig voneinander an zwei Orten. Ein bevorzugter Ablagerungsort ist das Interstitium des Nierenmarkes. Ein anderer das Glomerulum, wo die Amyloidablagerung bzw. -bildung im subendothelialen Raum und im Mesangium beginnt (Abb. 58).

Im fortgeschrittenen Stadium greift sie auf den subepithelialen Raum über. Das Übertreten von Amyloidmassen in den subepithelialen Raum wird begleitet von charakteristischen Deckzellenveränderungen (11, 14). Diese reichen von einer Retraktion der glomerulären Fußfortsätze bis zu einer partiellen Zerstörung der Deckzellausläufer mit Entblößung der glomerulären Basalmembran in der Spätphase der Krankheit.

Bei Amyloidosen des Menschen können die Amyloidablagerungen gleich im subepithelialen Raum beginnen. Dadurch bildet sich bereits in der Frühphase der Erkrankung ein nephrotisches Syndrom aus (14).
Bei der glomerulären Amyloidose der Maus entwickeln sich die Deckzellenveränderungen erst nachdem die glomerulären Basalmembranen und die Mesangiummatrix zunehmend von Amyloid durchsetzt sind und damit auch die Permeabilität dieser Strukturen für höher molekulare Proteinkomplexe zugenommen hat.

Bei sekundären Amyloidosen scheint das Vorhandensein von Amyloidvorläuferproteinen vom Typ des SAA-Proteines (24, 34, 35) wichtig zu sein. Aufgrund elektronenmikroskopischer (14, 15) und histochemischer Untersuchungen (39, 40, 47) kann angenommen werden, daß die Reaktion der ortsständigen Zellen auf vorhandene Amyloidvorläuferproteine für die extrazelluläre Entstehung von Amyloidfibrillen von großer Bedeutung ist. Die Reaktion der ortsständigen Zellen auf Amyloidvorläuferproteine, die in bindegewebige Strukturen eingelagert sind, entspricht im Prinzip der Reaktion bei frustraner Phagozytose (48): Da die veränderten Organstrukturen wie z.B. die glomeruläre Basalmembran nicht phagozytiert werden können, erfolgt eine Ausschleusung von lysosomalen Enzymen in den Extrazellularraum mit dem Ziel einer extrazellulären Strukturverdauung (14,15).
Im Normalfall führt dies zu einer nachfolgenden Regeneration der Struktur. Bei der Anwesenheit von polymerisationsfähigen Amyloidvorläuferproteinen, die nach partieller Andauung in der Lage sind Fibrillen zu bilden, kommt die für die Struktur-

regeneration notwendige Strukturanverdauung nicht zustande. Die Folge ist ein zunehmendes Wachstum der Amyloidmassen im Extrazellularraum, welches erst aufhört wenn keine Amyloidfibrillenvorläufer mehr gebildet werden. Für die Richtigkeit dieser Hypothese sprechen auch zwei Fälle geheilter Amyloidosen (v. Gise et al. in Vorb., Verh. d. Ges. in Med., 1982), bei denen es unter der Therapie zu einem Stillstand der Amyloidfibrillenbildung kam (15).
Solange Amyloidvorläufer gebildet und diese auf dem Blutwege in die Organstrukturen transportiert werden schreitet die Amyloidfibrillenbildung innerhalb der Organe fort, was schließlich die partielle oder totale Zerstörung der ortsständigen Zellen verursacht. Die Schäden an den glomerulären Podozyten sind hierbei - wie bereits in der Einführung ausführlich dargestellt - von wichtiger funktioneller Bedeutung für die Proteinfiltration.

Die glomerulären Podozytenfüßchen weisen bei den gesunden Tieren und in der Frühphase der Erkrankung eine regelrechte Fußfortsatzverzahnung auf (Abb. 8-11). Sie sind lang und schlank. Die Oberflächen der Zellen sind glatt. Die mikrovilliartigen Zytoplasmafortsätze der Deckzellenausläufer sind schmal und von mäßiger Zahl.
Nach 4 bis 5 Wochen täglicher Caseininjektion können dann im Bereich der glomerulären Deckzellen die ersten Veränderungen beobachtet werden (Abb. 14-25). Die Podozytenfüßchen erscheinen zunehmend verkürzt und plumper. Die Zelloberflächen sind in manchen Areale unregelmäßig und z.T. höckerig ausgebildet.

Die mikrovilliartigen Fortsätze der Deckzellen erscheinen vermehrt und ebenfalls verplumpt.

Die Verplumpung der Podozytenfüßchen und ihre flächenhafte Retraktion nimmt zur sechsten Woche hin (Abb. 26-33) deutlich zu. Dieses Stadium entspricht dem transmissionselektronenmikroskopischen Nachweis des Amyloids im subepithelialen Raum (Abb. 58, 59).

Nach achtwöchiger Injektionsdauer können an den glomerulären Deckzellen und ihren Ausläufern zunehmend degenerative Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 34-39), die auf eine schwere Schädigung der Podozyten durch die subepithelialen Amyloidmassen hindeuten. Die Zelloberflächen sind vermehrt unregelmäßig strukturiert und zeigen knotige Zytoplasmahöcker. Sie nehmen zur 9. Woche hin noch erheblich zu (Abb. 40-45). Teilweise erinnern sie bereits an Partialnekrosen der Deckzellausläufer.

In der 10. Injektionswoche (Abb. 50-57) können an den Deckzellen herdförmige Nekrosen der Deckzellausläufer beobachtet werden (Abb. 51, 53, 56, 57), die die Vorstufe für die besonders an Glomerula des Menschen nachgewiesenen Deckzellaufbrüche darstellen (11, 14). Die nekrotischen Zytoplasmaanteile können dann infolge des Filtrationsdruckes von der glomerulären Basalmembran abgehoben und abgeschwemmt werden. Den Endzustand kennzeichnen vor allem beim Menschen in einer Vielzahl nachweisbare Deckzellaufbrüche mit entblößter glomerulärer Basalmembran, durch die die Serumproteine annähernd ungehindert in den Bowmanschen Kapselraum übertreten können (14).

Transmissionselektronenmikroskopisch können in der 10. Injektionswoche bereits vereinzelt Podozytenablösungen im Bereich des Mesangiums beobachtet werden. Hier sind die Deckzellschäden stärker ausgeprägt als in der Kapillarperipherie. Die Mesangiumregion ist jedoch für die REM-Darstellung nicht zugänglich, da diese Strukturen weiter in der Tiefe liegen und von Zytoplasmaausläufern der Podozyten verdeckt werden.

Durch die semiquantitative Auswertung der Deckzellschlitze, die benachbarte glomeruläre Deckzellfüßchen zwischen sich begrenzen, konnte die fortschreitende Retraktion der Fußfortsätze während der Amyloidentstehung dokumentiert werden (Abb. 7). Bei der Kontrollgruppe entfielen im Mittel 140 von 400 Meßpunkten auf Deckzellschlitze. Dies entspricht etwa 35%. In der 3. bis 5. Injektionswoche dagegen projizierten sich nur noch 100 von 400 Meßpunkten auf Deckzellschlitze. Von der 6. bis zur 9. Woche nahm die Fußfortsatzverzahnung weiter ab. Im Laufe der Amyloidablagerung hatten sich die Spaltfläche insgesamt von relativ 35% auf im Mittel etwa 7% reduziert.

Damit muß eine Reduktion der glomerulären Filtrationsfläche einhergehen, denn durch die Deckzellen wird der transmembranöse Wasserfluß bei der Filtration maßgeblich beeinflußt. Aus Untersuchungen über Amyloidose bei Menschen ist bekannt, daß die glomerulär abgelagerten Amyloidmassen keine Reduktion der glomerulären Filtrationsleistungen bewirken (12, 13). Für die glomeruläre Filtrationsleistung bedeutet dies, daß

bei reduzierter Filtrationsfläche die glomeruläre Filtrationsrate nur aufrecht erhalten werden kann, wenn gleichzeitig ein erhöhter transmembranöser Wasserfluß durch die verbliebene Filtrationsfläche resultiert. Der erhöhte Wasserfluß durch die reduzierte Filtrationsfläche und insbesondere auch durch die Basalmembranabschnitte mit partieller Deckzellenablösung wird als wesentliche Triebkraft für die Proteinfiltration und damit für den Proteinverlust in den Endharn diskutiert (14, v. Gise et al., in Vorb.).

In Übereinstimmung mit dieser Interpretation konnte ab der 5. Injektionswoche eine deutliche Zunahme der täglichen Proteinausscheidung beobachtet werden (Abb. 6). Der verwendete Mäusestamm verfügt über eine physiologische Proteinurie, die bei etwa 80 mg Protein pro Tag liegt. Parallel zu den Veränderungen an den glomerulären Deckzellen (Abb. 7) mit Reduktion der Zahl der Filtrationsschlitze stieg die Proteinurie in der 5. bis 10. Injektionswoche im Mittel auf den doppelten Wert an.

Der Anstieg der Proteinurie selbst ist im Einklang mit einer zunehmenden Reduktion der glomerulären Filtrationsspalten durch Retraktion der Fußfortsätze und die nun flächenhafte Abdeckung der glomerulären Basalmembran durch Deckzellzytoplasma.

Die Verdopplung der Proteinausscheidung mit Beginn der glomerulären Deckzellveränderungen und ihre annähernde Konstanz bis zur 10. Woche bestätigen den Einfluß einer reduzierten Filtrationsfläche auf die Proteinfiltration.

Andererseits wird deutlich, daß allein durch die Reduktion der Filtrationsfläche auch bei ausgedehnten glomerulären Amyloid-

ablagerungen im subendothelialen Raum in der Basalmembran und in der Mesangiummatrix (Abb. 58, 59) keine extreme Proteinurie verursacht werden kann. Dies wurde auch bei den Amyloidosen des Menschen nachgewiesen (11).
Für die Proteinurie ist demnach nicht das Ausmaß der glomerulär abgelagerten Amyloidmassen entscheidend, sondern vor allen Dingen die Veränderungen im Bereich der glomerulären Deckzellen, die von einer Reduktion der Filtrationsfläche bis zur einer partiellen Ablösung der Deckzellausläufer von der Basalmembran reichen.

Die annähernde Vervierfachung der täglichen Urinausscheidung innerhalb der 10 Versuchswochen kann nicht durch die glomerulären Strukturveränderungen erklärt werden. Verantwortlich für die erhöhte Urinausscheidung sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die interstitiellen Amyloidablagerungen im Bereich des Nierenmarks. Die Ursachen hierfür dürften die anderen physikochemischen Eigenschaften des Amyloids und der Amyloidgrundsubstanz sein, die zu einer funktionellen Veränderung im Gegenstromsystem des Nierenmarkes führt. Funktionell könnte eine verminderte Konzentrationsfähigkeit im Vordergrund stehen, die wahrscheinlich aus Veränderungen der osmotischen Gradienten bei Amyloiddeponierung im Nierenmark resultiert.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Glomeruläre Deckzellenveränderungen bei sich entwickelnder Amyloidose treten erst in Erscheinung, wenn die primär subendothelial und mesangial beginnenden Amyloidablagerungen in den subepithelialen Raum vorgedrungen sind. In dieser Phase tritt noch keine wesentliche Proteinurie auf.

2. Mit dem Beginn der glomerulären Deckzellenveränderungen infolge von subepithelialen Amyloidablagerungen läßt sich ein zunnehmender glomerulärer Proteinverlust in den Endharn beobachten.

3. Die täglichen Proteinverluste sind in der Endphase des Versuchs nahezu konstant. Für die Ausbildung eines nephrotischen Syndroms sind jedoch höhere Proteinverluste mit schwerwiegenderen Veränderungen - Deckzellnekrosen mit Ablösungen von der glomerulären Basalmembran - notwendig.

4. Die Menge des glomerulär subendothelial und mesangial abgelagerten Amyloids hat keinen direkten Einfluß auf die täglichen Proteinverluste.

6. Die im Mittel auf das vierfache ansteigende Urinaus-

scheidung im Verlauf der renalen Amyloidose kann durch glomeruläre Veränderungen nicht erklärt werden. Wahrscheinlich ist sie durch Amyloidablagerungen mit Veränderungen der physiko-chemischen Eigenschaften der interstitiellen Matrix im Bereich des Gegenstromsystems des Nierenmarks verursacht.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1 Bailey, J. L.,
Techniques in Protein Chemistry.
Amsterdam: Esevier Publishing Company (1967), II, 341.

2 Bock, H.-E., Kaufmann W., Löhr, G.-W.,
Pathophysiologie.
Stuttgart: Thieme Verl. (1981), II, 405-407.

3 Brand, K., Cathcart, E. S., Cohen, A. S.,
A Clinical Analysis of the Course and Prognosis of
42 Patients with Amyloidosis.
Am. J. Med., 44 (1968), 955-969.

4 Britton, S.,
Exp. Amyloidosis: The Inducer is a Polyclonal B-Cell Activator to which Susceptibility is under Genetic Control.
J. exp. Med., 142 (1975), 1564-1569.

5 Bryde M., Missmahl H. P.,
Therapie der generalisierten Amyloidosen.
Karlsruhe: Therapiewoche, Heft 37 (1975).

6 Burk, H. C.,
Histologische Technik.
Stuttgart: Thieme Verl. (1973), III.

7 Cohen, A. S., Cathcart, E. S.,
Casein-Induced Experimental Amyloidosis.
Ed. by Bajusz E. and Jasmin G., Montreal.
Meth. Achievm. exp. Path., 6 (1972), 207-242.

8 Cohen, A. S. (et al.),
Resolution of Primary Amyloidosis During Chemotherapy.
Annals of Int. Med., 82 (1975), 466-473.

9 Dikmann, S. (et al.),
Resolution of Renal Amyloidosis.
Am. J. of Med., 63 (1977), 430-433.

10 Emmerich, B. (et al.),
Primäre Amyloidose mit nephrotischem Syndrom:
5-jähriger Verlauf unter kombinierter Chemotherapie.
Klin. Wochenzeitschrift, 58 (1980), 1207-1213.

11 Gise, v. H. (et al.),
Investigations on the Cause of the Nephrotic Syndrom
in Renal Amyloidosis.
Virchows Arch. (A) Path., Anat., 379 (1978), 131-141.

12 Gise, v. H.,
Renal Amyloidosis and Renal Insufficiency.
Clinical Nephrology, in Druck (1982).

13 Gise, v. H., Stark, B., Bohle, A.,
Nephrotic Syndrome and Renal Insufficiency in Association with Amyloidosis: A Correlation between Structur and Function.
Klin. Wochenzeitschrift, 59 (1981), 75-82.

14 Gise, v. H., Christ H., Bohle, A.,
Early Glomerular Lesions in Amyloidosis.
Virchows Arch. (A), Path., Anat., 390 (1981), 259-272.

15 Gise, v. H., (et al.),
Correlations between the Morphological and Clinical Findings in a Patient Recovering from Secondary Generalised Amyloidosis with Renal Involvment.
Virchows Arch. (A) Path. Anat., 379 (1978), 119-129.

16 Glenner, M.,
Amyloid Deposits and Amyloidosis (The ß-Fibrilloses).
New England J. of Med., Vol. 302, 23 (1980), 1283-1292.

17 Glenner, M.,
The Pathogenetic and Therapeutic Implications of the Discovery of the Immunoglobulin Origin of Amyloid Fibrils.
Human Pathology, Vol. 3, Nr. 2 (1972), 157-163.

Gruys und Henson siehe 47 und 48.

18 Heidrich, H.-G.,
Die moderne Routinepräparation biologischer Objekte für die Transelektronenmikroskopie.
Tech. Akad. Esslingen, Lg. 4763/02.146 (1980) Vortrag 1.

19 Hert, W.,
Die REM/TEM-Präparation von elektrisch nicht leitenden Objekten durch Sputterbeschichtung (Kathodenzerstäubung).
Tech. Akad. Esslingen, Lg. 4763/02.146 (1980) Vortrag 7.

20 Henning, J.,
Neue Hochleistungs-Turbo-Molekularpumpen zur Erzeugung von ölfreiem Hoch- und Ultravakuum.
Vakuum Technik 23. Jahrgang, 3 (1974).

21 Husby, G., Natvig J. B.,
A Serum Component Related to Nonimmunoglobulin Amyloid Protein AS, a Possible Precursor of the Fibrils.
J. of Clinical Investigations, 53 (1974), 1054-1061.

22 Lake, B., Andrew, G.,
Rheumatoid Arthritis with Secondary Amyloidosis and Malabsorbtion Syndrome.
Am. J. of Med., 44 (1968), 105-117.

23 Lange, R., Blödorn J.,
Das Elektronenmikroskop TEM und REM.
Stuttgart: Thieme Verl. (1981).

24 Lavie, G. (et al.),
Amyloid and Amyloidosis: Variations in the Susceptibility of Different Strains of Mice to the Development of Amyloidosis and the Production of SAA.
Exc. Med. Amsterdam. Int. Congress Ser. 497 (1980), 518-523.

25 Mackensen, S. (et al.),
The Influence of Glomerular and Interstitial Faktors on the Serum Creatinine Concentration in Renal Amyloidosis.
Virchows Arch. (A) Path. Anat., 375 (1977), 159-178.

26 Mc Adam, K. P. W. J., Sipe, J. D.,
Murine Model for Human Secondary Amyloidosis Genetic Variability of the Acute-Phase Serum Protein SAA Response to Endoxins and Casein.
J. exp. Med., 144 (1976), 1121.

27 Mitteilungen aus dem REM-Labor, Nr. 106.
Ed. Wetzlar: Firma Leitz.

28 Dto., Nr. 110.

29 Ohnsorge, J., Holm, R.,
Rasterelektronenmikroskopie - Eine Einführung.
Stuttgart: Thieme Verlag (1978), II.

30 Paweletz, N.,
Die Kritische-Punkt-Trocknung und ihre Probleme bei der Präparation biologischen Materials.
Techn. Akad. Esslingen, Lg. Nr. 4763/02.146 (1980), Vortrag Nr. 8.

31 Reimer, L., Pfefferkorn.,
Rasterelektronenmikroskopie.
Berlin: Springer Verl. (1977), II.

32 Rosenbauer, K. A.,
Moderne Routine- und Spezialpräparation biologischer Objekte für die Rasterelektronenmikroskopie.
Techn. Akad. Esslingen, Lg. Nr. 4763/02.146 (1980), Vortrag Nr. 3.

33 Rosenbauer, K. A., Kegel B.,
Rasterelektronenmikroskopische Technik.
Stuttgart: Thieme Verl. (1978).

34 Rosenthal, C. J. (et al.),
Isolation and Partial Characterization of SAA - an Amyloid-Related Protein from Human Serum.
J. of Immunology, USA, Vol. 116, Nr. 5 (1976), 1415-1418.

35 Rosenthal, C. J., Franklin, E. C.,
Serum Amyloid A (SAA) Protein-Interaktions with Itself and Serum Albumin.
J. of Immunology, USA, Vol. 119, Nr. 2 (1977), 630-635.

36 Scheinberg, M., Benett, M., Cathcart, S.,
Casein-Induced Experimental Amyloidosis:
The Response of Lymphoid Organs to T- and B-Mitogens.
Laboratory Investigations, Vol. 33, Nr. 1 (1975), 96-101.

37 Schubert, Bethke,
Lehrbuch der Pathologie.
Berlin: de Gruyter Verl. (1980), 90-97.

38 Schulz, R., T.,
Role of Altered Vascular Permeability in Amyloid Formation.
Am. J. of Path., Vol. 86, Nr. 2 (1977), 321-334.

39 Shirahama, T., Cohen A.,
An Analysis of the Close Relationship of Lyosomes to Early Deposits of Amyloid.
Am. J. of Path., Vol. 73, Nr. 1 (1979), 97-108.

40 Shirahama, T., Cohen, A.,
Intralysosomal Formation of Amyloid Fibrils.
Am. J. of Path., Vol. 81, Nr. 1 (1975), 101-110.

41 Sipe, . (et al.),
Detection of a Mediator Derived from Endotoxin-Stimmulat. Macrophages that Induces the Acut Phase SA a Response i. M.
J. exp. Med., 150 (1979), 597.

42 Skinner, M. D. (et al.),
Murine Amyloid Protein AA in Casein-Induced Experimental Amyloidosis.
Laboratory Investigation, Int. Acad. of Path., USA,
Vol. 36, Nr. 4 (1977), 420-427.

43 Skogen, B., Thorsteinson, L., Natvig, J.,
Degradation of Protein SAA to an AA-like Fragment by Enzymes of Monocytic Origin.
Scand. J. Immunol., 11 (1980), 533-544.

44 Sohar, E. (et al.),
Familial Mediterranean Fever:
A Survey of 470 Cases and Review of the Literature.
Am. J. Med., 43 (1967), 227.

45 Watanabe, T., Saniter, T.,
Morphological and Clinical Features of Renal Amyloidosis.
Virchows Arch. (A) Path. Anat., 366 (1975), 125-135.

46 Yonkosky D. (et al.),
Casein-Induced Experimental Amyloidosis.
J. of Immunology, 35 (1978), 133-139.

47 Gruys, E.,
Ultrastructural and Enzyme Histochemical Aspects of Amyloidosis in the Bovin Renal Medulla
Vet. Pathol., 12 (1975), 94-110.

48 Henson, P. M., Johnson, H. P., Spiegelberg, H. L.,
The Release of Granule Enzymes from Human Neutrophils Stimmulated by Aggregated Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses

LEBENSLAUF

Am 29. Juli 1948 wurde ich, Günther Beranek, als erster Sohn der Eheleute Meta und Josef Beranek, in Schönaich geboren.

Von 1955 bis 1963 besuchte ich die Volksschule Schönaich. Im Jahre 1963 wechselte ich an die "Höhere Handelsschule" in Böblingen, wo ich 1966 die "Mittlere Reife" ablegte.

Nach einem halbjährigen Betriebspraktikum trat ich 1966 in die "Berufsfachschule für Physikalisch-techn.-Assistenten" in Stuttgart/Feuerbach ein und schloß dort 1968 mit der Prüfung zum "Staatlich gepr. PTA" ab.

Im Jahr 1969 heiratete ich Margarete Beranek, geb. Ruppert.
Nach Praktika bei mehreren großen Industriebetrieben arbeitete ich von 1970 bis 1974 als Spezialist für submikroskopische Prüfverfahren in der "Staatl. Materialprüfanstalt" in Stuttgart/Vaihingen. Parallel zu dieser Tätigkeit besuchte ich abends das Eberhard-Ludwigs-Gymnasium in Stuttgart und bestand dort 1974 das Abitur.

Im Anschluß an den Grundwehrdienst studierte ich von 1975 bis 1979 Pharmazie in Tübingen. Nach dem 2. Examen im Sept. 1979, begann ich bei Prof. Dr. A. Bohle und Prof. Dr. H. P. T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im Mai 1982 abschloß.

Neben dieser Tätigkeit arbeite ich seit 3 Jahren stundenweise in einer öffentlichen Apotheke, um für mich, meine Frau und 3 Söhne den Lebensunterhalt zu verdienen.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren,

H. Auterhoff und K.A. Kovar (Pharm. Chemie), A. Bohle (Pathologie), R.E. Bader (Medizinische Mikrobiologie), E. Graf (Pharm. Technologie), E. Reinhard (Pharm. Biologie), K. A. Rosenbauer (Rasterelektronenmikroskopische Technik) und M. Siess (Pharmakologie).

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41